



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA, GENÉTICA Y EVOLUCIÓN

**“Evaluación de daño inducido por plaguicidas en la iguana
overa (*Tupinambis merianae*)”**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos

Aires en el área: **Ciencias Biológicas**

LIC. LAURA GISELA SCHAUMBURG

Director de Tesis: DRA. MARTA D. MUDRY
Director Asistente: DRA. GISELA L. POLETTA
Consejero de Estudios: DRA. MARTA D. MUDRY

Lugar de Trabajo: Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE), IEGEBA (CONICET-UBA), Dpto. de Ecología, Genética y Evolución, FCEyN, UBA. / Proyecto Iguana - Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (Facultad de Humanidades y Ciencias, UNL / Ministerio de Medio Ambiente, Prov. Santa Fe).

Bueno Aires, 2019

“Evaluación del daño inducido por plaguicidas en la iguana overa (*Tupinambis merianae*)”

RESUMEN

La iguana overa (*Tupinambis merianae*), especie endémica de Sudamérica, habita áreas de actividad agrícola creciente asociada al uso de formulaciones plaguicidas. El permanente riesgo de exposición a estos plaguicidas y sus residuos en todas las etapas de su vida, conlleva efectos no deseados con consecuencias a corto y largo plazo. Para caracterizar el potencial daño sobre el material genético, se adaptaron el Ensayo de Micronúcleo y el Ensayo Cometa, determinando el daño basal característico para la especie. Luego se evaluó la genotoxicidad de formulaciones de glifosato, cipermetrina y endosulfán, y su mezcla, considerando las distintas etapas de la vida: embriones expuestos en condiciones controladas (ECC), juveniles expuestos en condiciones semi-controlada (ECS), y monitoreo de poblaciones silvestres expuestas ambientalmente (PSEA; neonatos y adultos). Los resultados indicaron genotoxicidad en neonatos ECC y de PSEA, y en juveniles ECS. Se observó, además, efecto sobre el crecimiento en neonatos ECC a la formulación de glifosato Roundup® y en aquellos de PSEA. Los adultos de PSEA no mostraron genotoxicidad o cambios en su condición corporal. Se evidencia la importancia de una gestión integrada del uso de plaguicidas en ambientes naturales para proteger ésta y otras especies, así como el ecosistema.

Palabras claves: Reptiles, formulaciones, ensayos de exposición, monitoreo, etapas ontogénicas, efectos genotóxicos

“Induced damage assessment by pesticides in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*)”

ABSTRACT

The Argentine black and white tegu (*Tupinambis merianae*), an endemic South American species, inhabits areas of increasing agriculture activity associated to the use of pesticides formulations. The permanent risk of exposure to these pesticides formulations and their residues in all live stages, implies negative effects with short and long term consequences. To characterize the potential damage on the genetic material, the Micronucleus test and the Comet assay were adapted to be applied in this species, and the basal genetic damage was determined. Then, the genotoxicity of glyphosate, cypermethrin and endosulfan formulations and their mixture were evaluated, considering different life stages: embryos exposed under controlled conditions (ECC), juveniles exposed under semi-controlled conditions (ESC) and the biomonitoring of wild populations environmentally exposed (WPEE; neonates and adults). The results indicated genotoxicity in neonates ECC and those of WPEE, as well as in juveniles ESC. There were also effect on growth of neonates ECC to the glyphosate formulation Roundup® and those from WPEE. Adults from WPEE showed no effect on genotoxicity or changes in corporal condition. The results highlight the importance of perform an integrated management of pesticides use in natural environments to protect this and other species, as well as the whole ecosystem.

Key words: Reptiles, formulations, exposure assay, ontogenic stages, biomonitoring, genotoxic effects

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires por brindarme el lugar para llevar a cabo el desarrollo de mi trabajo doctoral y por la formación académica recibida. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas de posgrado otorgadas para realizar el doctorado. Al Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexos Vertebrados (FHUC-UNL/MMA-MUPCN, Santa Fe) por permitirme realizar los trabajos que involucró el desarrollo de esta Tesis.

A mis directoras, Dra. Marta M. Mudry y Dra. Gisela L. Poletta por guiarme y confiar en mí para llegar hasta el final de esta Tesis.

A una gran amiga, la Dra. Melina Simoncini por su apoyo constante y desinteresado y, enseñarse de todo y específicamente en lo referente al manejo de ejemplares de la iguana overa, así como su ayuda en cada detalle.

A todo el plantel que conforman el Proyecto Iguana y Yacaré, especialmente al Dr. Carlos Piña por su predisposición y estar siempre atento a mis inquietudes. Al Dr. Pablo Siroski por su colaboración. A Pamela, Agustina y Evelyn por su compañerismo y a Sofía por su gran ayuda en los muestreos.

A las chicas del laboratorio GIBE, Dras Nancy Andreoli, Lucia Fantini, Eliana Steinberg, Ana Tropea y Mariela Nieves por el compañerismo y generosidad, por las lindas charlas con mates de por medio y hacer que las jornadas de trabajo y estar lejos de casa, hayan sido muy amenas.

A Diego Bustamante por ayudarme en el trabajo de campo y en transmitirme todo su conocimiento sobre el manejo de las iguanas en la naturaleza.

A mis amigos, Diego, Carolina, Virginia por su incondicional predisposición e incentivo para hacer todo lo que se me ha ocurrido y perseguir mis sueños.

A mi familia, Blanca, José y Mauro por su inmenso amor, incondicional ayuda y acompañamiento en todo lo que quise emprender en la vida.

A los hombres de mi vida, Franco y Mario que me acompañaron, me alentaron en cada instante y sobre todo en los momentos más difíciles y me bancaron todo el tiempo que invertí en este trabajo y no estuve con ellos. Por último, a mi pequeño Lucas que me acompañó en el último tramo durante la escritura de la tesis.

DEDICATORIA

Las decisiones son solamente el comienzo de algo. Cuando alguien toma una decisión, se sumerge en una poderosa corriente que lleva a una persona hasta un lugar que jamás hubiera soñado en el momento de decidirse.

A Blanca y José.

A mis hijos, Franco y Lucas.

A Mario

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	II
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	10
CAPÍTULO I: Aspectos generales	12
1.1. INTRODUCCIÓN	13
1.1.1. IMPACTO AMBIENTAL DE LOS PLAGUICIDAS	13
1.1.1.1. Características de los Plaguicidas	15
1.1.1.2. Formulaciones comerciales: Características y usos	18
1.1.1.3. Glifosato	19
1.1.1.3.1. Características generales	19
1.1.1.3.2. Mecanismos de acción	22
1.1.1.3.3. Toxicidad	23
1.1.1.4. Cipermetrina	25
1.1.1.4.1. Características generales	25
1.1.1.4.2. Mecanismos de acción	26
1.1.1.4.3. Toxicidad	27
1.1.1.5. Endosulfán	28
1.1.1.5.1. Características generales	28
1.1.1.5.2. Mecanismos de acción	30
1.1.1.5.3. Toxicidad	31
1.1.2. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DEL USO MASIVO DE PLAGUICIDAS EN ARGENTINA	32
1.1.3. BIOMARCADORES Y MONITOREO AMBIENTAL	38
1.1.3.1. Tipos de biomarcadores	39
1.1.3.2. Biomarcadores de exposición	39
1.1.3.3. Biomarcadores de susceptibilidad	40
1.1.3.4. Biomarcadores de efecto	40
1.1.3.5. Niveles de análisis del daño genotóxico	43
1.1.4. MODELO DE ESTUDIO: IGUANA OVERA	45
1.1.4.1. Características biológicas	45

1.1.4.2. Distribución geográfica	48
1.1.4.3. Ambiente, recursos y dieta	49
1.1.4.4. Ciclo de vida	50
1.1.4.5. Comportamiento	53
1.2. HIPÓTESIS	54
1.3. OBJETIVOS	55
1.3.1. OBJETIVO GENERAL:	55
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	56
CAPÍTULO II: Puesta a punto de biomarcadores de genotoxicidad y niveles basales de daño en <i>S. merianae</i>	57
2.1. INTRODUCCIÓN	58
2.1.1. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD	58
2.1.1.1. Ensayo Cometa	58
2.1.1.2. Ensayo de Micronúcleo (MN)	61
2.1.2. DAÑO BASAL AL ADN Y FACTORES DE VARIABILIDAD EN REPTILES	68
2.1.3. ANTECEDENTES DE GENOTOXICIDAD EN REPTILES	71
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	72
2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES UTILIZADOS	72
2.2.1.1. En la puesta a punto de los biomarcadores a estudiar	72
2.2.1.2. En la determinación de los valores basales de daño al ADN	72
2.2.2. DETERMINACIÓN DE EDAD, SEXO Y PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE LOS ANIMALES	74
2.2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA	75
2.2.4. ENSAYO COMETA	76
2.2.4.1. Puesta a punto del protocolo para <i>S. merianae</i>	77
2.2.4.2. Determinación del Índice de Daño Basal (IDB)	79
2.2.5. ENSAYO DE MICRONÚCLEO	79
2.2.5.1. Puesta a punto del protocolo para <i>S. merianae</i>	79
2.2.5.2. Determinación de la Frecuencia basal de MN (FBMN)	79
2.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	80
2.3. RESULTADOS	80
2.3.1. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO COMETA	80
2.3.2. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEO	82
2.3.3. TASA DE DAÑO BASAL EN FUNCIÓN DE LA EDAD	83
2.3.4. TASA DE DAÑO BASAL EN FUNCIÓN DEL SEXO	87
2.3.5. TASA DE DAÑO BASAL EN FUNCIÓN DEL NIDO DE ORIGEN	87
2.4. DISCUSIÓN	88
CAPÍTULO III: Exposición <i>in ovo</i> y efecto genotóxico inducido por plaguicidas	96
3.1. INTRODUCCIÓN	97
3.1.1. TOXICIDAD DE PLAGUICIDAS EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES	97
3.1.1.1. Ensayos de prueba y modelos animales	97
3.1.1.2. Teratogénesis y/o Embriotoxicidad de Plaguicidas	99
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	102
3.2.1. ORIGEN DE HUEVOS UTILIZADOS	102
3.2.2. QUÍMICOS UTILIZADOS	103
3.2.2.1. Formulados de plaguicidas	103

3.2.2.2. Control positivo y de vehículo	103
3.2.2.3. Preparación de concentraciones evaluadas	103
3.2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS	105
3.2.3.1. Experimental A: exposición <i>in ovo</i> al formulado de glifosato (GLIF; Roundup® Full II)	105
3.2.3.1.1. Primer Experimental A (EA1)	105
3.2.3.1.2. Segundo Experimental A (EA2)	108
3.2.3.2. Experimental B: exposición <i>in ovo</i> al formulado de Endosulfán (ENDO; Galgofan®), al de Cipermetrina (CIP; Atanor®) y a la mezcla de estos plaguicidas	108
3.2.3.2.1. Primer Experimental B (EB1)	109
3.2.3.2.2. Segundo Experimental B (EB2)	110
3.2.4. VARIABLES REGISTRADAS EN NEONATOS	110
3.2.4.1. Éxito de eclosión y malformaciones externas	110
3.2.4.2. Genotoxicidad	111
3.2.4.2.1. Muestras de sangre periférica de neonatos	111
3.2.4.2.2. Ensayo Cometa	111
3.2.4.2.3. Ensayo de MN	111
3.2.4.2.4. Ensayo de Anormalidades Nucleares (AN)	111
3.2.4.3. Seguimiento postnatal	112
3.2.4.3.1. Individualización de los neonatos	112
3.2.4.3.1.1. Registro fotográfico	113
3.2.4.3.1.2. Cortes de uñas-falange	113
3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	114
3.3. RESULTADOS	116
3.3.1. EXPERIMENTAL A: EXPOSICIÓN <i>IN OVO</i> AL FORMULADO DE GLIFOSATO	116
3.3.1.1. Primer Experimental A:	116
3.3.1.2. Segundo Experimental A:	119
3.3.2. EXPERIMENTAL B: EXPOSICIÓN <i>IN OVO</i> AL FORMULADO DE ENDOSULFAN (ENDO; GALGOFAN®), AL DE CIPERMETRINA (CIP; ATANOR®) Y A LA MEZCLA DE ESTOS PLAGUICIDAS	124
3.3.2.1. Primer Experimental B	124
3.3.2.2. Segundo Experimental B	128
3.4. DISCUSIÓN	132
3.4.1. ÉXITO DE ECLOSIÓN Y MALFORMACIONES EXTERNAS	133
3.4.2. GENOTOXICIDAD DE FORMULADOS ESTUDIADOS	135
3.4.3. CRECIMIENTO POSTNATAL	142
 CAPÍTULO IV: Exposición de juveniles de <i>S. merianae</i> a plaguicidas bajo condiciones semi-controladas	 147
 4.1. INTRODUCCIÓN	 148
4.1.1. FUNDAMENTOS DEL DISEÑO	148
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	150
4.2.1. JUVENILES DE IGUANA OVERA	150
4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	151
4.2.2.1. Experimentales	151
4.2.2.2. Características de los recintos	151
4.2.2.3. Alimentación	152
4.2.2.4. Exposición	153
4.2.3. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	154
4.2.4. VARIABLES REGISTRADAS	154

4.2.4.1. Datos morfométricos	154
4.2.4.2. Genotoxicidad	155
4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	155
4.3. RESULTADOS	156
4.3.1. MORFOMETRÍA	156
4.3.2. GENOTOXICIDAD	158
4.4. DISCUSIÓN	163
CAPÍTULO V: Biomonitorio de adultos y neonatos de <i>Salvator merianae</i> expuestos ambientalmente a plaguicidas	169
<hr/>	
5.1. INTRODUCCIÓN	170
5.1.1. REPTILES Y EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS	170
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	173
5.2.1. MUESTREOS	173
5.2.1.1. Áreas de muestreo	173
5.2.1.2. Cuevas	175
5.2.2. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	176
5.2.2.1. Adultos	176
5.2.2.2. Neonatos	178
5.2.3. VARIABLES REGISTRADAS	179
5.2.3.1. Datos morfométricos	179
5.2.3.2. Genotoxicidad	180
5.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	180
5.3. RESULTADOS	181
5.3.1. ADULTOS	181
5.3.2. NEONATOS	183
5.4. DISCUSIÓN	188
CAPÍTULO VI: Conclusiones y Perspectivas	193
<hr/>	
6.1. INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	194
6.2. CONCLUSIONES FINALES	199
6.3. PERSPECTIVAS	200
BIBLIOGRAFÍA	202
ANEXO 2.1	242

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación general de los plaguicidas más aplicados en Argentina según el organismo sobre el que actúan y el grupo químico al que pertenecen (Aiassa, 2012).....	16
Tabla 1.2. Clasificación de plaguicidas según su grado de peligrosidad basándose en la DL ₅₀ aguda de formulados, sólidos o líquidos, en ratas expuestas por vías oral o dérmica, y color de banda de etiquetado que le corresponde establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014).....	17
Tabla 2.1. Índice de daño (media ± DE) al ADN en eritrocitos de <i>S. merianae</i> a dos tiempos de <i>unwinding</i> y electroforesis.....	81
Tabla 2.2. Valores morfométricos y de genotoxicidad basal en neonatos de <i>S. merianae</i>	83
Tabla 2.3. Valores morfométricos y de genotoxicidad basal en juveniles de <i>S. merianae</i>	84
Tabla 2.4. Valores morfométricos y de genotoxicidad basal en adultos de <i>S. merianae</i>	85
Tabla 2.5. Valores (media ± DE) morfométricos y de genotoxicidad basal de adultos de <i>S. merianae</i> según el sexo	87
Tabla 2.6. Frecuencia de MN e Índice de daño basal (media ± DE) en <i>S. merianae</i> según el nido de origen y la edad	88
Tabla 3.1. Concentraciones de referencias utilizadas para determinar las concentraciones aplicadas en <i>S. merianae</i>	104
Tabla 3.2. Grupos y concentraciones aplicadas en el primer experimental de exposición <i>in ovo</i> a RU (EA1).	106
Tabla 3.3. Grupos y concentraciones aplicadas en el segundo experimental de exposición <i>in ovo</i> a RU (EA2).	108
Tabla 3.4. Grupos y concentraciones aplicadas en el primer experimental de exposición <i>in ovo</i> a CIP y ENDO (EB1).....	109
Tabla 3.5. Grupos y concentraciones aplicadas en el segundo experimental de exposición <i>in ovo</i> a CIP, ENDO y mezcla de formulaciones evaluadas (EB2).	110
Tabla 3.6. Índice de daño al ADN (media ± DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> del Experimental A1, según el grupo experimental.....	117
Tabla 3.7. Frecuencia de MN y AN (media ± DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> del Experimental A1, según el grupo experimental.....	117
Tabla 3.8. Peso y LHC (media ± DE) al eclosionar y su incremento a los 6 meses de vida de ejemplares de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> en el Experimental A1, según el grupo experimental.....	118
Tabla 3.9. Índice de daño al ADN (media ± DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> del Experimental A2, según el grupo experimental.....	119
Tabla 3.10. Frecuencia de MN y AN (media ± DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> del Experimental A2, según el grupo experimental.....	120
Tabla 3.11. Peso trimestral (media ± DE) de ejemplares de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> en el Experimental A2, según el grupo experimental.....	120
Tabla 3.12. LHC trimestral (media ± DE) de los neonatos de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> en el Experimental A2, según el grupo experimental.....	121

Tabla 3.13. Resultados de regresión lineal y logarítmica entre valores de genotoxicidad y el peso o la LHC al eclosionar.....	123
Tabla 3.14. Frecuencia de MN y AN (media \pm DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> del Experimental B1, según el grupo experimental.....	125
Tabla 3.15. Peso trimestral (media \pm DE) de ejemplares de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> en el Experimental B1, según el grupo experimental.....	126
Tabla 3.16. LHC trimestral (media \pm DE) de ejemplares de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> en el EB1, según el grupo experimental.....	126
Tabla 3.17. Frecuencias de MN y AN (media \pm DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> del Experimental B2, según el grupo experimental.....	130
Tabla 3.18. Peso trimestral (media \pm DE) de neonatos de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> en el Experimental B2, según el grupo experimental.....	131
Tabla 3.19. LHC trimestral (media \pm DE) de neonatos de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> en el Experimental B2, según el grupo experimental.....	131
Tabla 4.1. Dosis de agroquímicos aplicadas a campo y su equivalente aplicado en el experimental bajo condiciones ambientales semi-controladas.....	154
Tabla 4.2. LHC y Peso de los individuos del primer ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.....	157
Tabla 4.3. LHC y Peso de los individuos del segundo ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.....	158
Tabla 4.4. Valores individuales y medias (\pm DE) de genotoxicidad en el primer ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.....	159
Tabla 4.5. Valores individuales y medias (\pm DE) de genotoxicidad en el segundo ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.....	160
Tabla 5.1. Datos de adultos de <i>S. merianae</i> muestreados.....	177
Tabla 5.2. Datos de nidos de <i>S. merianae</i> cosechados en las zonas muestreadas.....	179
Tabla 5.3. Parámetros individuales de LHC de adultos de <i>S. merianae</i> por año de muestreo y la zona de muestreo.....	181
Tabla 5.4. Media (\pm DE) de LHC de adultos de <i>S. merianae</i> , según el sexo y año de muestreo.....	182
Tabla 5.5. Genotoxicidad (media \pm DE) en adultos de <i>S. merianae</i> muestreados, de acuerdo al año y zona de muestreo.....	182
Tabla 5.6. Medias (\pm DE) de la morfometría de neonatos de <i>S. merianae</i> de acuerdo al año, nido y la zona de muestreo.....	184
Tabla 5.7. Medias (\pm DE) de morfometría de neonatos de <i>S. merianae</i> de acuerdo al año eclosión y la zona de muestreo.....	184
Tabla 5.8. Genotoxicidad (media \pm DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> de acuerdo al año de eclosión y la zona de muestreo.....	187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura química del glifosato, forma neutra. Extraído de Kier y Kirkland (2013).	20
Figura 1.2. Estructura química de la cipermetrina. Extraído de Costa (2008).	25
Figura 1.3. Estructura química de los esteroisómeros del endosulfán: alfa-endosulfán (a la izquierda) y beta-endosulfán (a la derecha). Extraído de Betancur <i>et al.</i> (2015).....	28
Figura 1.4. Mapa de distribución geográfica del área sembrada con soja (ha) en Argentina hasta la campaña 2017/2018. Fuente: Depto. Estimaciones Agrícolas, Bolsa de Cereales de Buenos Aires (2018).	33
Figura 1.5. Diagrama de niveles de evaluación genotóxica. Modificado de Mudry y Carballo (2006).	44
Figura 1.6. Individuos de <i>S. merianae</i> de tres edades diferentes donde se observa el cambio en el patrón de coloración del tegumento. Barra= a) 1 cm, b) 2 cm, c) 8 cm. Fotos: a-b) L.G. Schaumburg, y c) P.A. Siroski.....	46
Figura 1.7. Área de distribución geográfica de <i>S. merianae</i> en América del Sur (Scott <i>et al.</i> , 2016).....	48
Figura 1.8. Área de distribución de <i>S. merianae</i> en la Argentina. Extraído de Scott <i>et al.</i> (2016) y modificado por L.G. Schaumburg.	49
Figura 1.9. Nido de iguana overa hecho en la base del tronco de un árbol de paraíso (<i>Melia azedarach</i>). Se observa la entrada al nido (a; barra= 20 cm), y los huevos de la iguana overa en el lecho del nido rodeado por material vegetal húmedo (b; barra= 4 cm).....	52
Figura 2.1. Principios generales de la formación del cometa en condiciones alcalinas. Modificado de Shaposhnikov <i>et al.</i> (2009).....	59
Figura 2.2. Tipos de daño en la doble cadena del ADN. Modificado de Lord y Ashworth (2012).	60
Figura 2.3. El esquema muestra las distintas vías que pueden dar origen a los MNs a partir de la acción de agentes clastogénicos y aneugénicos. Tomado de Araldi <i>et al.</i> (2015).....	64
Figura 2.4. Eritrocitos de sangre periférica de <i>S. merianae</i> . Tinción con Giemsa, magnificación 1000X. Barra= 25 μ m.	67
Figura 2.5. Imagen satelital de la provincia de Santa Fe donde se visualiza (A) la ubicación de la Reserva Natural Manejada “El Fisco” en el centro-norte de la provincia (icono rojo), y (B) el área de extensión de la reserva donde se colectaron los huevos de iguana overa. Tomada de Google Earth.....	73
Figura 2.6. Extracción de sangre a un adulto de <i>S. merianae</i> . Barra= 4 cm. Foto: L.G. Schaumburg.....	76
Figura 2.7. Diferentes niveles de daño al ADN (0-4) que pueden ser detectados con el ensayo cometa. La figura muestra nucleoides observados en muestras de sangre periférica de <i>S. merianae</i> , teñidas con BE. Magnificación de 400X. Barra= 10 μ m. Fotos tomadas por L.G. Schaumburg.	78
Figura 2.8. Índice de daño (media \pm DE) obtenido en la prueba de 10 min de <i>unwinding</i> y 15 min de electroforesis del Ensayo Cometa en eritrocitos de la iguana overa expuestos <i>in vitro</i> a 3 concentraciones de H ₂ O ₂ y el control negativo (n= 3 en cada grupo). *Diferencias estadísticamente significativas respecto del control negativo ($p < 0,05$; ANOVA y test de Tukey).	82

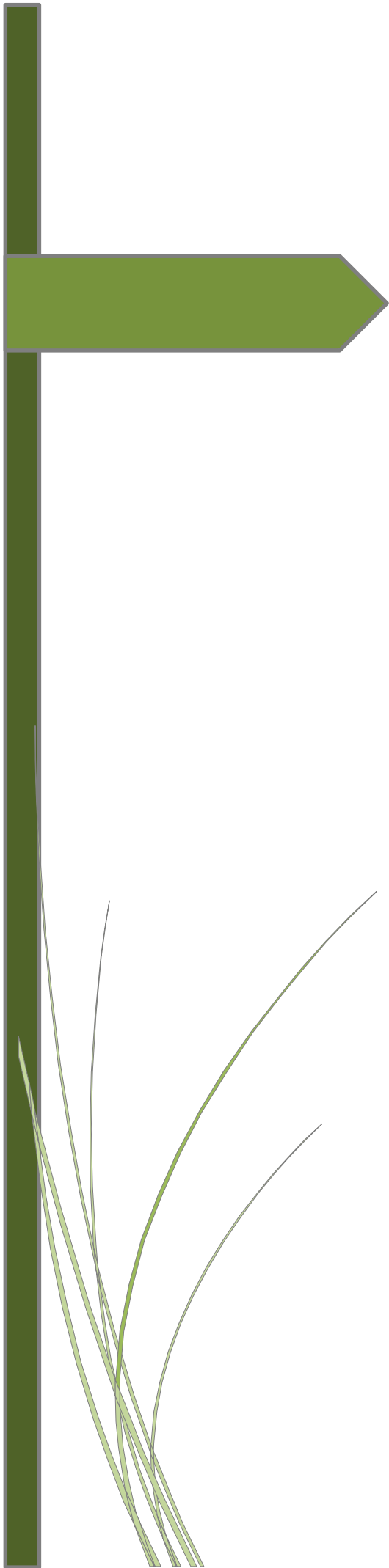
Figura 2.9. Eritrocitos de sangre periférica de <i>S. merianae</i> , donde se muestra la presencia de un MN (flecha; 1000X). Barra= 20 μ m.	82
Figura 2.10. Frecuencia basal de MN (media \pm DE) en individuos de <i>S. merianae</i> según el rango etario evaluado (24 neonatos, 21 juveniles y 20 adultos). *Estadísticamente significativo respecto de los neonatos ($p= 0,002$; <i>test de Mann Whitney</i>).	86
Figura 2.11. Índices de daño basal (media \pm DE) obtenidos en las tres edades evaluadas de <i>S. merianae</i> (24 neonatos, 21 juveniles y 20 adultos). *Estadísticamente significativo respecto de juveniles y adultos ($p<0,001$; <i>test de Mann Whitney</i>).	86
Figura 3.1. Incubadora utilizada para el Experimental A1 de exposición de huevos de iguana overa a distintas concentraciones de RU (GLIF 66,2 %). En la tapa se observa el foco de luz mediante el cual se le brindó calor. Barra= 10 cm.	106
Figura 3.2. Aplicación tópica de concentraciones de RU sobre la cáscara en la cara superior del huevo de iguana overa. Barra = 1 cm.	107
Figura 3.3. Huevos de iguana overa envueltos con tul para asegurar la correcta identificación de las crías al nacer. Barra= 1 cm.	107
Figura 3.4. Esquema y foto de categorías de Anormalidades Nucleares analizadas en eritrocitos de la iguana overa. a) Brote Nuclear, barra= 12 μ m; b) Núcleo con Muesca, barra= 10 μ m; c) Núcleo Irregular, barra= 10 μ m; d) Núcleo Excéntrico, barra= 12 μ m; e) Eritrocito Anucleado, barra= 10 μ m.	112
Figura 3.5. Patrón de manchas único e irrepetible en la parte ventral del cuerpo de una iguana overa. Barra= 1 cm.	113
Figura 3.6. Incremento de la LHC (media \pm DE) de los animales de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> del Experimental A2, durante el primer año de vida. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estandar de la media.	122
Figura 3.7. Incremento del peso (media \pm DE) de los ejemplares de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> del Experimental A2, durante el primer año de vida. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estandar de la media.	123
Figura 3.8. Índice de Daño (media \pm DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> del Experimental B1. CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100 μ g/huevo de ciclosfosfamida; CIP: distintas concentraciones de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de endosulfán. *Indica diferencia estadísticamente significativa con el CN ($p< 0,05$; ANOVA-Dunnett).	125
Figura 3.9. Evolución del incremento del peso de los ejemplares de <i>S. merianae</i> durante el primer año de vida post-exposición <i>in ovo</i> del EB1. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estandar de la media.	127
Figura 3.10. Evolución del crecimiento de la LHC en los ejemplares de <i>S. merianae</i> durante el primer año de vida post-exposición <i>in ovo</i> del EB1. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estandar de la media.	128
Figura 3.11. Índice de daño (media \pm DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> post-exposición <i>in ovo</i> del Experimental B2. CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100 μ g/huevo de ciclosfosfamida; CIP: distintas concentraciones de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de endosulfán. *Indica diferencia estadísticamente significativa respecto al CV ($p< 0,05$; <i>Test de Kruskal Wallis-Mann Whitney</i>).	129
Figura 3.12. Frecuencia de MN (media \pm DE) en neonatos de <i>S. merianae</i> post exposición <i>in ovo</i> del Experimental B2. CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100 μ g/huevo de ciclosfosfamida; CIP: distintas concentraciones de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de endosulfán. *Indica diferencia	

estadísticamente significativa respecto al CV ($p < 0,05$; <i>Test de Kruskal-Mann Whitney</i>).....	130
Figura 4.1. Recinto tratado con los agroquímicos: A) al inicio y, B) al final del experimental donde se muestra el efecto del herbicida sobre la vegetación alrededor del recinto. Las fotos fueron tomadas desde diferentes ángulos. Barras (color blanco) = 50 cm. Recinto control: C) al inicio, y D) al final del experimental donde se observa que no hubo cambios en la vegetación. Barras (color blanco) = 35 cm	152
Figura 4.2. Comparación del Índice de daño (media \pm DE) generado en las dos instancias de experimentación semi-controlada. * Diferencia estadísticamente significativa respecto del control en el primer y segundo ensayo ($p < 0,05$; <i>Test de Mann Whitney</i>).....	161
Figura 4.3. Comparación de la frecuencia de MN (media \pm DE) generado en las dos instancias de experimentación semi-controlada. * Diferencia estadísticamente significativa respecto del control en primer y segundo ensayo ($p < 0,05$; <i>Test de Mann Whitney</i>).....	161
Figura 4.4. Frecuencias de AN (media \pm DE) en eritrocitos de <i>S. merianae</i> obtenidos en el segundo ensayo de exposición semi-controlada a agroquímicos. BN: brote nuclear; NM: núcleo con muesca; NI: núcleo irregular; NE: núcleo excéntrico; EritA: eritrocito anucleado; ANT: anomalías nucleares totales. *Diferencia estadísticamente significativa respecto del control ($p < 0,05$; <i>T Student</i>).....	162
Figura 5.1. Localización de una cueva de iguana overa en el borde un cultivo de soja. El círculo rojo indica la entrada a la cueva en la base de un árbol de la especie paraíso (<i>Melia azedarach</i>), a 2 m de distancia de la primera línea de soja sembrada. Barra= 40 cm.	174
Figura 5.2. Localidades donde se realizaron los muestreos en cuevas o madrigueras con la presencia de adultos y/o huevos de <i>S. merianae</i> . Barra= 80 km.	175
Figura 5.3. Medición de LHC de una hembra de la zona no expuesta. Barra= 35 cm.....	176
Figura 5.4. Vista del interior de la cueva de una iguana overa donde se observa la cámara de incubación con los huevos apoyados sobre una base de material de nido muy húmedo (foto izquierda; barra= 2 cm), y vista superior de la cámara de incubación extraído del nido conteniendo los huevos en su interior (foto derecha; barra= 5 cm).	178
Figura 5.5. LHC (media \pm DE) de neonatos de <i>S. merianae</i> expuestos y no expuestos ambientalmente a plaguicidas de las tres temporadas monitoreadas. *Indica diferencia estadísticamente significativa entre expuesto y no expuesto de ese año ($p < 0,001$, medias marginales, Bonferroni). # Indica diferencia significativa en crías no expuestas del 2015 con los demás años. ## Indica diferencia significativa del 2015 respecto de los demás años ($p < 0,001$; <i>ANOVA factorial, Bonferroni</i>).....	185
Figura 5.6. Peso (media \pm DE) de neonatos de <i>S. merianae</i> expuestos y no expuestos <i>in situ</i> a plaguicidas de las tres temporadas monitoreadas. *Indica diferencia estadísticamente significativa entre expuesto y no expuesto en esos años ($p < 0,001$; medias marginales, Bonferroni). #Indica diferencia significativa entre 2013 y los demás años en crías no expuestas. ## Indica diferencia significativa entre 2014 y 2015, y ### entre 2013 y los demás años ($p < 0,01$, <i>ANOVA factorial</i>).	186

ABREVIATURAS

AMPA	ácido aminometil fosfónico
ANOVA	análisis de la varianza
ANs	anormalidades nucleares
ANT	anormalidades nucleares totales
BN	brote nuclear
BE	Bromuro de Etidio
CL50	concentración letal 50
CASAFE	Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes
CAS	Chemical Abstract Service Number Registered
CIP	cipermetrina
CITES	Convención Internacional para el Tráfico de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
cm	centímetro
CN	control negativo
COP	Contaminantes Orgánicos Persistentes
CP	control positivo
CV	control vehículo
DL50	dosis letal 50
DT90	Degradación total 90 (en días)
EA	Experimental A
EB	Experimental B
EC	Ensayo Cometa
EFSA	European Food Safety Authority
ENDO	endosulfán
EritA	eritrocito anucleado
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FAO	Food and Agriculture Organization
FBMN	frecuencia basal de micronúcleos
g	gramo
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GLIF	glifosato
ha	hectárea
IARC	International Agency for Research on Cancer
ID	índice de daño
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IUCN	International Union for Conservation of Nature
Kg	kilogramo
L o l	litro
LHC	longitud hocico-cloaca
m	metro
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar

MN	micronúcleo
NRC	National Research Council
NE	núcleo excéntrico
NM	núcleo con muesca
NI	núcleo irregular
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud (<i>en inglés</i> WHO World Health Organization)
P.A.	Principio Activo
POEA	surfactante polioxietileno-amina
PI	Proyecto Iguana
RDC	ruptura de doble cadena
RSC	ruptura de simple cadena
RU	Roundup Full II® (formulación comercial de herbicida a base de glifosato)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
µg	microgramo
UE	Unión Europea
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
µl	microlitro
µM	micromolar
USEPA	United States of Environmental Protection Agency



CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES

1.1. INTRODUCCIÓN

El modelo de estudio de la presente Tesis doctoral al inicio de la misma estaba incluido en el género *Tupinambis*, familia *Teiidae*. Posterior a una revisión taxonómica de toda la familia realizado por Harvey *et al.* (2012) se realizó el cambio de género anterior por el actual, *Salvator*. Por ello, en la carátula se muestra el género “Tupinambis” en el título y en el cuerpo de la Tesis se muestra “Salvator”.

El marco teórico de esta Tesis toma en consideración las implicancias ambientales y en salud humana ante el uso desmedido de agroquímicos que acompaña a las prácticas de la agricultura en nuestro país. Es un fenómeno que condujo a la modificación de los ecosistemas tanto en su estructura como en su dinámica, íntimamente relacionado con la explotación de las tierras, la degradación de los ambientes y la presencia de diversos químicos que se aplican con fines de manejo y de obtención de mejores rindes económicos a corto plazo. La comunidad científica, principalmente de nuestro país, ha avanzado en el estudio sobre cómo esta temática afecta la conservación de las especies silvestres cuyas distribuciones naturales se solapan con las áreas de gran crecimiento productivo agronómico, considerando que muchas de ellas cumplen con funciones tan relevantes como el control biológico de plagas. Así, el monitoreo biológico de especies como la iguana overa (*Salvator merianae*) es de gran importancia ecológica ya que forma parte de la biodiversidad de nuestra fauna autóctona. Al mismo tiempo, resulta un aporte a la economía regional como recurso natural a partir del aprovechamiento de cueros por parte de pobladores locales que viven en áreas con actividades económicas poco redituables, convirtiéndose así también en un recurso sociocultural. El Proyecto Iguana, donde se enmarca la presente Tesis doctoral, tiene una cuota de acopio habilitada de 1.000.000 cueros anuales desde toda la provincia de Santa Fe.

1.1.1. IMPACTO AMBIENTAL DE LOS PLAGUICIDAS

Muchos avances tecnológicos relacionados con la intensificación moderna de la agricultura muestran que los mayores rendimientos se obtuvieron principalmente a través del uso de

fertilizantes y plaguicidas (Schaaf, 2013). La decisión de la utilización de estos compuestos se basa en un análisis de costo-beneficio en términos preferentemente económicos, permitiendo así que el agronegocio maneje la economía de los países sudamericanos como ser Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (López et al., 2012). Sin embargo, hay otro aspecto que en general ha recibido y recibe aún hoy muy poca o ninguna atención, estamos hablando del costo ambiental que conlleva la introducción de estos compuestos tóxicos en el medio natural (Quarcoo *et al.*, 2014). Se observa que, con el paso de los años, la aplicación intensiva de plaguicidas ha provocado una saturación en las tierras de explotación agrícola, debido a la fácil dispersión y uso indiscriminado de estos químicos (Alegria *et al.*, 2008). Es así como van reduciendo la calidad de los ambientes y como efectos secundarios tienen la capacidad de perjudicar a organismos inocuos o incluso beneficiosos para el ecosistema (Quarcoo *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que más de un tercio de la superficie terrestre es destinada a la agricultura (37%), el impacto de los plaguicidas resulta significativo a escala global (FAO, 2018). Sin embargo, aun cuando se apliquen según lo recomendado, y eso en la mayoría de los casos no sucede, 60 años después de uso en todo el mundo, los efectos secundarios de los plaguicidas en ecosistemas terrestres son cada vez más visibles (Sibley y Hanson, 2011). Estos constituyen una cascada de eventos que afectan negativamente no sólo a las poblaciones de organismos no blanco de los plaguicidas sino al ecosistema en su conjunto. Entre ellos, se encuentran la disminución de la densidad de poblaciones y la biodiversidad de aves como consecuencia de la reducción en la abundancia y diversidad del alimento (plantas, semillas e insectos) y la ingesta de elementos contaminados con plaguicidas (Quero *et al.*, 2016; Addy-Orduna *et al.*, 2019), la disminución de la diversidad de anfibios, el incremento de infecciones con parásitos (trematodos), la disminución de artrópodos benéficos que llevan a cabo la polinización, y la eliminación de los depredadores y parasitoides naturales de las especies plaga (Rohr *et al.*, 2008; Lajmanovich *et al.*, 2010; Sánchez-Bayo, 2011; Collins, 2019). Esto conlleva serios efectos desestabilizadores en las comunidades de invertebrados dando lugar a la recuperación y aumento de la resistencia de las plagas. Además, la

movilización de los plaguicidas hacia los cuerpos de agua ya sea por lixiviación o escorrentías, impacta sobre la flora y fauna propias de esos ecosistemas (Sánchez-Bayo, 2011).

1.1.1.1. Características de los Plaguicidas

El término **plaguicida**, según la *Food and Agriculture Organization* (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se refiere a cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos o productos agrícolas, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. Es importante aclarar que el término “plaga” no sólo involucra a plantas o animales, sino que se extiende a todo “ser vivo que aparece repentinamente y de manera masiva causando un impacto adverso” sobre el ambiente o el hombre, ya sea por acción directa de estos sobre el ambiente o por acción indirecta mediante la transmisión de agentes patógenos que amenazan la salud pública (RAE, 2012). En este sentido, los plaguicidas pueden clasificarse según diferentes características tales como origen, naturaleza química, toxicidad, blanco de acción, entre otros. Sin embargo, ninguna clasificación hasta el presente es generalizable y aplicable a todo el espectro de agentes químicos, siendo necesario un sistema de clasificación que tenga en cuenta las propiedades químicas y biológicas del agente y las características de exposición (Klassen *et al.*, 2008).

Los plaguicidas, de acuerdo a su origen, pueden ser naturales o sintéticos, siendo éstos últimos los de mayor comercialización. Si se toma en cuenta su composición química, se clasifican en: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y otros (Cid, 2014). En el mercado se encuentran los más diversos formulados que contienen diferentes composiciones químicas, siendo las mayorías desconocidas, no especificadas al consumidor en las etiquetas de los productos ya que se encuentran resguardadas por la ley de protección de patentes (USEPA, 2018). Desde el punto de vista toxicológico, los productos con características químicas similares pueden producir intoxicaciones análogas y requieren medidas preventivas y/o tratamientos similares (Cid, 2014), pero la utilización de formulaciones plaguicidas y mezclas complejas de ellas desafía los criterios

toxicológicos básicos. En consideración al organismo blanco (o su etapa de desarrollo), los plaguicidas se agrupan en: insecticidas, herbicidas, fungicidas, alguicidas, rodenticidas, acaricidas, molusquicidas, entre otros (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación general de los plaguicidas más aplicados en Argentina según el organismo sobre el que actúan y el grupo químico al que pertenecen (Aiassa, 2012).

Plaguicida	Organismos blanco	Grupos de plaguicidas
Insecticida y acaricidas	Insectos y ácaros	Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos, Piretroides, Neonicotinoides
Fungicida	Hongos	Inorgánicos: contienen azufre, cobre y mercurio. Orgánicos: tiazoles, triazinas .
Rodenticida	Roedores	Cumarínicos No cumarínicos
Herbicida	Malezas	<u>Inorgánicos</u> : sulfamato amónico, buratos, etc. <u>Orgánicos</u> : heterocíclicos con nitrógeno (triazínicos, triazólicos), derivados del ácido fosfórico, bipiridilos (compuestos de Amonio), entre otros.

En cuanto a la toxicidad, la OMS ha recomendado una clasificación de los plaguicidas, de acuerdo a los riesgos que implica el uso de los mismos, sujeta a actualizaciones periódicas (OMS, 2014). Esta clasificación se basa en la dosis letal media (DL_{50}) aguda, por vía oral o dérmica en ratas, según las características y clase toxicológica del principio activo (OMS, 2014). Además, se establece una banda de color de acuerdo a la categoría toxicológica a la que pertenecen los principios activos de los formulados que se comercializan, dicha información debe aparecer en la parte inferior de la etiqueta de los envases (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Clasificación de plaguicidas según su grado de peligrosidad basándose en la DL₅₀ aguda de formulados, sólidos o líquidos, en ratas expuestas por vías oral o dérmica, y color de banda de etiquetado que le corresponde establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014).

CLASE TOXICOLÓGICA	Formulación Líquida DL ₅₀ (mg/kg) * aguda		Formulación Sólida DL ₅₀ (mg/kg) * aguda		Color de banda
	Vía oral	Vía dérmica	Vía oral	Vía dérmica	
I-a Productos sumamente peligrosos	<20	<40	>5	<10	Rojo (PMS 199 C)
I-b Productos muy peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100	Rojo (PMS 199 C)
II Productos Moderadamente peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	100 a 1000	Amarillo (PMS amarillo C)
III Productos poco peligrosos	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000	Azul (PMS 293 C)
IV Productos que normalmente no ofrecen peligro	> a 3000	-----	> a 2000	-----	Verde (PMS 347 C)

* DL₅₀ es la dosis (mg/kg de peso corporal) que causa la muerte en el 50 % de los organismos expuestos.

Los distintos plaguicidas pueden variar por su especificidad, dependiendo de los mecanismos bioquímicos o fisiológicos destinados a afectar sólo a un grupo de organismos (selectivos) o ser similar para varios taxones (amplio espectro). La toxicidad y la especificidad de los plaguicidas dependen del modo de acción a nivel celular o fisiológico, mientras que los efectos sobre los organismos dependen de la dosis a la que se exponen. En este punto resulta importante detenernos en el concepto de “dosis”. Este término se define como la cantidad de un xenobiótico que fue absorbida por el organismo y se expresa en la unidad del xenobiótico en relación al peso corporal del organismo, asociada a una unidad de tiempo. La administración de una dosis puede darse en un único evento o en varios episodios (Sánchez-Bayo, 2011) asociándose a efectos agudos y crónicos,

respectivamente, dependiendo también de la vida media del organismo en cuestión. Ante un evento único de exposición, los organismos expuestos directamente a los plaguicidas pueden experimentar en corto plazo, efectos tóxicos agudos. Ahora si los eventos de exposición son continuos o en forma reiterada, abarcando un período determinado de la vida del organismo, los efectos adversos se verán a largo plazo. Esta distinción es importante sobre todo cuando se trata de los plaguicidas, ya que en su mayoría son aplicados en una, dos o varias repeticiones en la misma temporada de siembra de acuerdo con los requerimientos del cultivo y las recomendaciones del formulado (Sánchez-Bayo, 2011). Esa exposición crónica conlleva a efectos que no se manifiestan rápidamente sino en cuestión de meses y años. El contacto con dosis subletales de manera repetida y prolongada en el tiempo suele ser acumulativo y conducir a daños a nivel de órganos y sistemas, causando enfermedades en el mediano o largo plazo, en períodos más tardíos de la vida o en la descendencia de los organismos expuestos (Aiassa, 2012).

1.1.1.2. Formulaciones comerciales: Características y usos

Las formulaciones comerciales de plaguicidas se componen de una combinación de varios compuestos químicos que incluyen el principio activo (PA) con actividad biocida y otros ingredientes denominados “inertes” ya que no poseen acción biocida *per se* y comprenden una serie de funciones diferentes. Entre ellos se encuentran los solventes (agua, derivado del petróleo), humectantes, espesantes y tensoactivos o surfactantes que facilitan la acción del PA. La forma física del PA no es siempre la misma como tampoco lo es la formulación en la cual se usa. Un mismo PA puede ser comercializado bajo diferentes “aspectos o formatos” (Cid, 2014). Los formulados se comercializan como líquidos, sólidos o gaseosos. Los sólidos se presentan en polvos, gránulos y cebos, los líquidos en solución y suspensión, mientras que la presentación gaseosa es en tabletas o ampollas. La toxicidad de una formulación comercial generalmente depende de la concentración del PA en la formulación, y puede variar según la función del producto y la presencia de los coadyuvantes, excedentes o impurezas asociadas (Cid, 2014).

Dentro del amplio espectro de formulaciones utilizadas en la actividad agrícola, el glifosato (GLIF) sigue siendo el herbicida más vendido tanto en el mundo (Van Bruggen *et al.*, 2018) como en nuestro país (Aparicio *et al.*, 2015), debido al incremento de su uso asociado a cultivos de soja resistente, bajo el sistema de siembra directa. Entre los insecticidas de mayor uso se encuentran formulados de CIP, clorpirifos y, hasta su prohibición en el año 2013, también de ENDO (Res. N° 511/11; SENASA, 2011).

En este contexto, podemos mencionar algunas de las principales marcas de la extensa lista registrada en el SENASA (2014):

- Con distintos porcentajes de GLIF como PA: *Rinder, Estrella, Roundup, glifosato La Tijereta y glifosato Atanor.*
- Con distintos porcentajes de CIP como PA: *Vendaval, cipermetrina Atanor 25, Xiper 25, Nurelle 25 E y Galgotrin.*
- Con distintos porcentajes de ENDO como PA, antes de su prohibición en el país: *Thiodan 35 EC, Galgofan, endosulfán 35 Nufarm, Zebra Ciagro SF y endosulfán Atanor 35,* entre otros (SENASA, 2009).

El presente trabajo doctoral se focalizó en el estudio de los efectos subletales asociados al uso de tres formulaciones ampliamente utilizadas en los últimos 20 años en cultivos de soja, con GLIF, CIP y ENDO como PA. Por tal motivo resulta pertinente hacer una revisión acerca de las características de los PA en cuestión.

1.1.1.3. Glifosato

1.1.1.3.1. Características generales

El glifosato (N-(fosfonometil) glicina; CAS 1071-83-6) es un ácido en sí mismo. Su forma de uso más frecuente es el de sal, conocida como sal de isopropilamina (EXTOXNET, 1996), y su fórmula molecular es $C_3H_8NO_5P$ (Fig. 1.1).

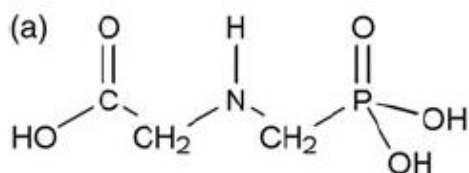


Figura 1.1. Estructura química del glifosato, forma neutra. Extraído de Kier y Kirkland (2013).

Es un compuesto soluble en agua (11,6 g/L a 25 °C), con baja solubilidad en solventes orgánicos ($\text{LogP} < -3,2$ a 20 °C), presión de vapor despreciable ($1,31 \times 10^{-2}$ mPa a 25 °C) y una constante de disociación (pKa) de 2,3 a 25 °C (Blake y Pallett, 2018). Tiene un coeficiente de partición Octanol-agua (K_{ow}) bajo, de -3,22 a -2,77 y un coeficiente de partición carbono orgánico/agua (K_{oc}) alto, estimado en 24.000 (USEPA, 2016), por lo que tiene la tendencia a ser absorbido (retenido) fuertemente por las partículas del suelo, dependiendo de las características del mismo (Aparicio *et al.*, 2013). Se comporta como un herbicida sistémico de amplio espectro, no selectivo y se lo utiliza para el control de malezas anuales y perennes, incluyendo hierbas, hierbas de hoja ancha y plantas leñosas en diferentes ambientes tanto forestales y paisajísticos como agrícolas, vinculado principalmente al cultivo de soja genéticamente modificada (Martin, 2011). En las actividades agrícolas, el GLIF se utiliza en distintos momentos del ciclo del cultivo para generar un barbecho químico, un proceso que se realiza después de la cosecha y la siembra directa del cultivo siguiente, con el objetivo de almacenar los recursos energéticos que requiera el cultivo en la temporada siguiente (Papa y Massaro, 2005). Su capacidad herbicida fue identificada por primera vez en 1970 y en 1974 Monsanto Company Inc. (St. Louis, MO, USA) comercializó el primer formulado a base de GLIF bajo el nombre de Roundup®, el que pronto ganó popularidad como un herbicida seguro y ambientalmente benigno (Gianessi y Reigner, 2007; Duke y Powles, 2008).

Un capítulo aparte merece la información acerca de los surfactantes ya que el plaguicida como formulación comercial es una mezcla compleja, no es el químico en su estado puro. Los surfactantes y coadyudantes en las formulaciones comerciales de GLIF permiten que este pueda atravesar las cutículas foliares cerosas y las membranas celulares hidrofóbicas de las malezas. Si bien existe una

gran variedad de surfactantes, el más tradicional utilizado en las formulaciones de herbicidas a base de GLIF es el polioxietil-amina (POEA) (Annett *et al.*, 2014). Las dosis de aplicación recomendadas para el cultivo de soja varían dependiendo de las malezas presentes en los lotes y las formulaciones utilizadas (Martin, 2011). Los formulados de Roundup® son aplicados en una concentración al 2-3%, es decir 2-3 L del compuesto diluidos en 100 L agua/ha (CASAFE, 2007).

Se considera que el GLIF se descompone rápidamente en el suelo, sin embargo, se ha descrito en la literatura que puede tener un comportamiento ambiental persistente, dependiendo del tipo de suelo (especialmente con fuerte capacidad de adsorción) y de las condiciones climáticas (por ejemplo, suelos secos, bajas temperaturas) (Annett *et al.*, 2014; Bento *et al.*, 2019). Por esta razón, la bibliografía muestra un amplio rango de valores de vida media del GLIF en suelos tanto en la Argentina como en otras partes del mundo, que varía desde unos pocos días hasta meses (Annett *et al.*, 2014; Villarreal, 2018). En nuestro país, un estudio informó una vida media de 6 días y DT90 de 19,8 días (tiempo requerido para que el 90% del compuesto desaparezca del suelo) en áreas de cultivo de soja, y 11,1 y 15,4 días (respectivamente) en áreas de cultivo de maíz (Bento *et al.*, 2019). En aguas de lagunas, el GLIF tiene una vida media de 5,77 días para una dosis de 6 mg/L y 7,73 días para una dosis de 12 mg/L (Pérez *et al.*, 2007). Se ha descrito que la persistencia del formulado se debe a que el GLIF se une fuertemente a las partículas de ciertos tipos de suelo por adsorción y se inactiva rápidamente, aunque también hay evidencias de que este herbicida puede ser fácilmente desorbido en algunas clases de suelo, liberándose de las partículas y movilizándose en el mismo (Aparicio *et al.*, 2013). La volatilización y fotodegradación del herbicida es casi despreciables (Jachetta *et al.*, 1986). Estudios recientes indican que una considerable proporción de GLIF aplicado no se degrada totalmente durante el ciclo del cultivo debido a la elevada tasa de aplicación en cada ciclo, pudiendo “pseudo-persistir” y acumularse (Primost *et al.*, 2017; Villarreal, 2018). Si hay degradación, la vía de descomposición primaria del GLIF en el suelo es a través de la actividad microbiana, donde las bacterias del suelo son las principales responsables. De este proceso se obtiene AMPA y/u otros metabolitos intermediarios según la disponibilidad de microorganismos

descomponedores específicos (Bento *et al.*, 2019). Este metabolito ha sido objeto de numerosos estudios ya que tiene mayor persistencia en el ambiente que el propio GLIF, con 54,7 días de vida media y 182 días de DT90 en zonas con cultivos de soja, y de 71 y 236 días (respectivamente) en zonas con cultivos de maíz (Bento *et al.*, 2019). La presencia de ambos compuestos fue reportada en distintas matrices ambientales a nivel mundial y local (Ronco *et al.*, 2016; Villarreal, 2018), generando preocupaciones en toda la comunidad científica. En zonas agrícolas de Entre Ríos se registraron concentraciones máximas en matrices sólidas (suelo: 8105 y 38939 µg/kg; sedimento: 3294 y 7219 µg/kg; partículas suspendidas: 584 y 475 µg/kg de GLIF y AMPA) entre las más altas reportadas en el mundo, y concentraciones máximas en aguas superficiales (1,80 y 1,90 µg/L de GLIF y AMPA), aunque no se observaron concentraciones detectables de ambos compuestos en agua subterránea (Primost *et al.*, 2017). En la Región Pampeana Bonaerense, se hallaron concentraciones entre 4 y 5 mg/kg de GLIF en suelo luego de la primera aplicación y 0,5 mg/kg luego del primer evento de lluvia (a los 3 días de la primera aplicación de GLIF). En este último, se observó que las aguas de escorrentías contenían concentraciones desde 0,10 hasta 0,70 mg/L en dos sitios cerca de cultivos de soja (Peruzzo *et al.*, 2008). También, se han encontrado cantidades variables de GLIF y AMPA en hojas y granos de soja transgénica cultivada en nuestro país (Landry *et al.*, 2005; Kolpin *et al.*, 2006; Mañas, 2012).

1.1.1.3.2. Mecanismos de acción

El GLIF ejerce su acción herbicida a través del contacto directo con el follaje y la subsiguiente distribución por toda la planta, siendo insignificante el ingreso por el sistema radical en plantas terrestres (Williams *et al.*, 2000). De esta manera, el herbicida ingresa y suprime la capacidad de la maleza para generar aminoácidos aromáticos, ya que actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) que se encuentra en el cloroplasto y es la responsable de la formación de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano. La EPSPS es una enzima que forma parte de la ruta metabólica del ácido shikímico. Este ácido sólo se encuentra en plantas y algunos microorganismos, por lo que en un principio se pensaba que la ausencia de esta vía metabólica en

otras formas de vida como los vertebrados minimizaría la toxicidad en ellos (Aparicio *et al.*, 2013; Schrödl *et al.*, 2014; Van Bruggen *et al.*, 2018). Sin embargo, es de amplio conocimiento que en el ambiente se aplican formulaciones comerciales y no el principio activo puro.

1.1.1.3.3. Toxicidad

El uso desmedido del GLIF y su presencia en distintas matrices ambientales, así como en productos comestibles, y el gran incremento de una variedad de estudios en distintos organismos en los últimos 10 años generó grandes preocupaciones, por lo que la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC) de la OMS decidió realizar una revisión de los trabajos publicados en relación a sus caracterizaciones y efectos. En base a los posibles efectos secundarios a largo plazo se concluyó que el GLIF debía reclasificarse como una sustancia cancerígena del grupo 2A, “probable carcinógeno para los seres humanos” (IARC, 2015). Sin embargo, la EPA de Estados Unidos (USEPA) y el Instituto Alemán de Evaluación del Riesgo (Bundesinstitut für Risikobewertung: BfR) -este último a pedido de la Unión Europea (UE)- luego de cuatro años de estudios concluyeron lo contrario (CASAFE, 2015). La nueva categorización de la IARC generó discrepancia con la USEPA sobre la genotoxicidad del GLIF, que se asocia al valor informativo de los estudios revisados por estas Instituciones. Por un lado, la USEPA se basó en estudios regulatorios encargados por el solicitante (99% con resultados negativos) y la IARC se basó en estudios publicados por la comunidad científica mundial (70% con resultados positivos). La USEPA evaluó datos de toxicidad del GLIF técnico (compuesto puro), mientras que la IARC revisó los resultados de toxicidad de los formulados a base de GLIF y sus componentes y/o metabolitos. Como último punto, la evaluación de la USEPA se centró en la exposición de la población típica por consumo de cultivos alimentarios, sin abordar riesgos y exposición ocupacional que generalmente es más alta. En cambio, la IARC evaluó datos de exposición por dieta típica, riesgo ocupacional y escenarios de exposición elevada (Benbrook, 2019). Si bien los escenarios de exposición alta en seres humanos eventualmente surgen de una combinación de eventos asociados a la manipulación de los formulados de GLIF, la frecuencia de estos episodios ocurre en millones de veces al día a nivel mundial (Benbrook, 2019). No obstante, la exposición por

vía alimenticia tiene una gran relevancia dado que, en su mayoría todos estamos expuestos a los residuos de GLIF en los alimentos que consumimos a diario. Los estudios de cohorte la IARC indicaron daño cromosómico en células sanguíneas de personas expuestas a formulados de GLIF. También se informó una fuerte evidencia de que el PA, diferentes formulados y el ácido aminometilfosfónico pueden inducir estrés oxidativo en animales de experimentación y en estudios *in vitro* en humanos (IARC, 2015). A estas alturas, la bibliografía ofrece una gran variedad de evidencias sobre los efectos letales y subletales de las formulaciones a base de GLIF en diferentes organismos. Por citar algunos ejemplos, la colonización de micorrizas disminuye en plantas tratadas con GLIF y afecta al crecimiento de las gramíneas blanco y no blanco de acción del herbicida (Helander *et al.*, 2018). Se esperaba que el GLIF fuera inocuo para las abejas, sin embargo, la exposición al herbicida demostró ser dañino para la salud de estos insectos, por ejemplo, puede alterar la comunidad de bacterias intestinales y aumentar la susceptibilidad de las abejas a infecciones por patógenos oportunistas (Motta *et al.*, 2018), afecta a la capacidad cognitiva de las abejas para recuperar e integrar información espacial en pos de un retorno exitoso a la colmena (Balbuena *et al.*, 2015). En otros invertebrados, la exposición a distintos formulados de GLIF indujo una disminución de la actividad de lanzamiento de superficie y reducción de la tasa de reproducción en especies de anélidos (Gaupp-Berghausen *et al.*, 2015), mortalidad, disminución del peso y del nivel de lípidos y proteínas en los músculos en crustáceos (Avigliano *et al.*, 2014). Efectos negativos sobre el consumo de presas, construcción de redes, la fecundidad, la fertilidad y el tiempo de desarrollo de la progenie en la araña *Alpaida veniliae* (Benamú *et al.*, 2010). En vertebrados, la exposición de peces a GLIF produjo alteraciones en la actividad de enzimas claves en las defensas antioxidantes y cambios hematológicos (Modesto y Martínez, 2010; Murussi *et al.*, 2016) y efectos genotóxicos (de Castilhos Ghisi y Cestari, 2013; Moreno Cestari *et al.*, 2014). Las especies de anfibios suelen mostrar alta sensibilidad a los plaguicidas, en relación al GLIF. Carvalho *et al.* (2018) observaron daño al ADN en renacuajos de *Dendropsophus minutus* a muy bajas concentraciones de una formulación del herbicida. Las concentraciones ambientalmente relevantes del herbicida causaron altas tasas de

mortalidad en renacuajos en distintas especies e indujo cambios morfológicos en una de las especies (Relyea, 2018; Peluso *et al.*, 2019) y diversos efectos en el desarrollo embrionario (Paganelli *et al.*, 2010; Carrasco, 2013; Babalola *et al.*, 2019). En especies reptilianas se ha reportado genotoxicidad (López González *et al.*, 2013; Schaumburg *et al.*, 2016; López González *et al.*, 2017), peroxidación lipídica y estrés oxidativo por dos formulaciones de GLIF diferentes (Burella *et al.*, 2018), alteraciones en parámetros inmunológicos (Mestre *et al.*, 2019), valores alterados de proteínas plasmáticas y efectos negativos en el crecimiento de los animales expuestos (Latorre *et al.*, 2013).

1.1.1.4. Cipermetrina

1.1.1.4.1. Características generales

Los piretroides son análogos sintéticos de piretrinas, sustancias con actividad insecticida obtenidas a partir de las flores de una especie de crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Todos los piretroides se conforman a partir de mezclas de isómeros y la potencia insecticida es muy distinta para los diferentes isómeros. Los piretroides se distinguen de acuerdo a su estructura química en dos grupos (Palmquist *et al.*, 2012):

- Tipo I: aquellos compuestos que carecen del grupo alfa-ciano, como la permetrina
- Tipo II: los que se componen del grupo alfa-ciano, como la deltametrina

La CIP pertenece al Tipo II, constituido por una mezcla de isómeros *cis* y *trans* de alfa-ciano-3-fenoxibencil 2,2-dimetil -3-(2,2-diclorovinil) ciclopropano carboxilato (Fig. 1.2; CAS 52315-07-8).

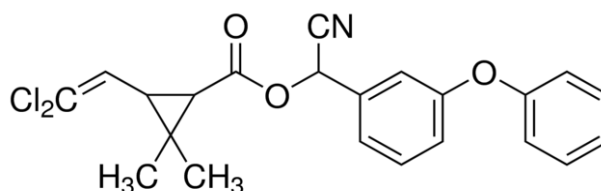


Figura 1.2. Estructura química de la cipermetrina. Extraído de Costa (2008).

La CIP es un líquido amarillo viscoso, poco soluble en agua (0,01 mg/L a 20°C) y muy soluble en solventes orgánicos (metanol, acetona o xileno). Es un potente insecticida sintético de amplio

espectro que actúa por contacto e ingestión sobre lepidópteros, hemípteros y otros órdenes de insectos de importancia agrícola. También se utiliza en productos de uso veterinario para el control de moscas, pulgas, garrapatas, piojos, ácaros, entre otros. En cultivos hortícolas es utilizado en aplicaciones foliares, y en los cultivos de soja se aplica antes de la floración y de la aparición de plagas puntuales. Las dosis recomendadas varían 0,10 y 0,20 L/ha, dependiendo de las formulaciones utilizadas y las plagas objetivo (Demetrio *et al.*, 2014).

Una presión de vapor de $1,3 \times 10^{-9}$ mmHg, un coeficiente de Kow de $3,98 \times 10^6$ y un coeficiente de Koc de $6,1 \times 10^4$ mL/g o cm^3/g (Kollman y Segawa, 1995) indican que la CIP tiene una baja tendencia de volatilizar y una alta afinidad por la materia orgánica, suelos y arcillas. Su fuerte tendencia a ser absorbido por el suelo y materia orgánica permite que este compuesto no migre significativamente de las zonas de aplicación directa, excepto las partículas transportadas por el viento o el agua. Teniendo en cuenta estas características, la CIP tiene una persistencia moderada en suelos. En condiciones aeróbicas, su vida media es de 4 días a 8 semanas (Wauchope *et al.*, 1992), mientras que es más persistente en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, las propiedades del suelo (materia orgánica y textura), las condiciones ambientales (temperatura y humedad), y la concentración de CIP aplicada al suelo pueden modificar su vida media en el suelo (Ismail *et al.*, 2012). El estudio de Battu *et al.* (2009) informó una rápida disipación de CIP desde las hojas de algodón después de la aplicación, con una disminución entre el 50-52% en el primer día y, al mismo tiempo comentó que los residuos decayeron por debajo de los niveles detectables en 21 días. Aun así, este insecticida es seis veces más persistente en el suelo que en el agua y es relativamente estable a pH ácido, pero es inestable en medio alcalino ($\text{pH} > 8$). Dependiendo de las condiciones, la vida media ambiental de la CIP varía de 2 días (por hidrólisis) a 165 días (por fotólisis en el suelo) (Burr, 2014).

1.1.1.4.2. Mecanismos de acción

La CIP bloquea los canales de Na^+ a nivel de las membranas neuronal, prolongando su tiempo de apertura (Wolansky y Tornero-Velez, 2013). Esto causa una descarga repetitiva de las señales nerviosas, alterando el circuito del impulso nervioso y generando en el organismo un estado nervioso

alterado (Palmquist *et al.*, 2012). Si el fenómeno es prolongado puede llevar a la muerte del insecto. La cinética de la interacción sobre estos canales difiere cuantitativamente con los distintos componentes del agente aplicado, situación que explicaría los distintos efectos provocados por los piretroides (Tippe, 1987). Los piretroides de Tipo II producen salivación acuosa profusa, temblores secundarios, aumento del tono extensor, moderada hiperexcitabilidad del reflejo y convulsiones, entre otros (Gupta y Milatovic, 2014).

1.1.1.4.3. Toxicidad

Ambas clases de piretroides tienen una gama similar de toxicidad en mamíferos. Sin embargo, los piretroides de Tipo II como la CIP y la deltametrina son generalmente más tóxicos que los de Tipo I, como la permetrina (Ray y Forshaw, 2000). En particular, la CIP es un compuesto moderadamente tóxico, clasificado bajo la categoría II según la USEPA y como Plaguicida de Uso Restringido, dada su toxicidad en peces, crustáceos y abejas (EXTOXNET, 1996a). Los valores de CL_{50} para peces están en el intervalo de 0,4 a 2,8 $\mu\text{g/L}$ y para otros organismos acuáticos oscilan entre 0,03 $\mu\text{g/L}$ (crustáceos), 9,0 $\mu\text{g/L}$ (renacuajos-anfibios), mientras que para un tipo de oligoqueto es de 71,12 $\mu\text{g/L}$ (Saha y Kaviraj, 2008). Para dos especies de anfibios de nuestro país *Hypsiboas pulchellus* y *Physalaemus biligonigerus*, los valores varían de 129 a 175,2 $\mu\text{g/L}$ (Izaguirre *et al.*, 2000; Agostini *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, presenta baja toxicidad para mamíferos y aves con fuerte selectividad para insectos, especialmente para las abejas melíferas (DL_{50} oral= 0,03-0,12 $\mu\text{g/abeja}$), e invertebrados (Fishel, 2005). La exposición del reptil *Caiman latirostris* durante su periodo embrionario a concentraciones subletales de CIP indujo genotoxicidad (1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/huevo}$; López González *et al.*, 2017), daño oxidativo (1, 10, 1000 $\mu\text{g/huevo}$) y alteración en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (10 y 1000 $\mu\text{g/huevo}$; Burella *et al.*, 2018). La toxicidad aguda en ratas por vía oral varía de acuerdo al sexo, en machos la DL_{50} es de 297 mg/kg y en hembras es de 372 mg/kg (Soderlund *et al.*, 2002). La ingesta diaria aceptable (IDA) establecida por la Reunión Conjunta sobre residuos de Plaguicidas de la FAO y la OMS para la CIP es de 0 - 0,02 mg/kg peso corporal en humanos. Los estudios en ratones han demostrado una posible genotoxicidad en el bazo y la médula ósea. La USEPA clasificó a este

insecticida como un posible carcinógeno humano basado en adenomas benignos de pulmón encontradas en ratones, sin embargo, los efectos crónicos no han sido reportados en humanos (Burr, 2014).

1.1.1.5. Endosulfán

1.1.1.5.1. Características generales

El ENDO grado técnico es una mezcla de los isómeros alfa y beta, en una proporción de 7:3. Su nombre químico es 3-óxido de 6, 7, 8, 9, 10, 10-hexacloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahidro-6,9-metano-2, 4, 3 benzodioxatiepina y su fórmula es $C_9H_6Cl_6O_3S$ (CAS n° 115-29-7 del producto técnico; Fig. 1.3).

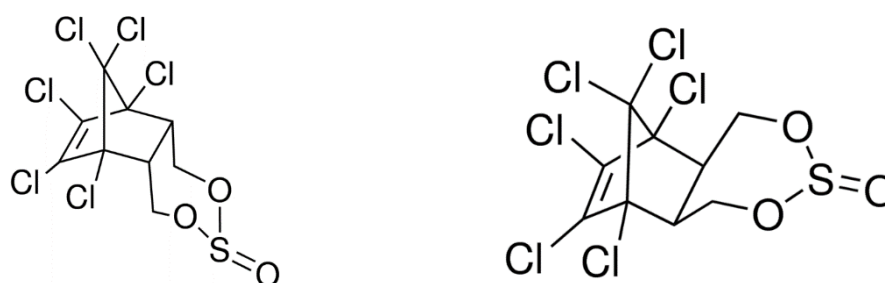


Figura 1.3. Estructura química de los esteroisómeros del endosulfán: alfa-endosulfán (a la izquierda) y beta-endosulfán (a la derecha). Extraído de Betancur *et al.* (2015)

El ENDO pertenece a los compuestos organoclorados del grupo de los ciclodienos, su estructura química corresponde a los hidrocarburos clorados aromáticos que fueron desarrollados pocos años después de la Segunda Guerra Mundial e introducidos comercialmente en 1956. Tiene un peso molecular de 406,96, es prácticamente insoluble en agua (0,32 mg/L a 22°C) y soluble en solventes orgánicos como acetona, xileno, etanol, etc. Tiene punto de fusión entre 70 y 100°C, con una presión de vapor de 1200 Pa a 80 °C. Es estable a la luz solar y sujeto a una hidrólisis lenta por el alcohol y dióxido de azufre (Gupta y Gupta, 1979).

Es un insecticida-acaricida de amplio espectro y actúa por contacto e ingestión sobre insectos chupadores y masticadores que llegan a ser plaga en distintos cultivos agrícolas. En América del Sur, este insecticida se usa principalmente tanto en el cultivo de soja como en los de otras oleaginosas, cereales y también en hortalizas. El uso de los plaguicidas del grupo de los ciclodienos ya ha sido

prohibido en muchos países por los problemas ambientales y de la salud pública con los que se los ha podido relacionar (Devine *et al.*, 2008; Souza Casadinho, 2009). El ENDO ingresó en la lista inicial de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) del convenio de Estocolmo y ha sido prohibido en 60 países debido a sus características de alta toxicidad, persistencia, bioacumulación y capacidad de transporte a grandes distancias (Harikrishnan y Usha, 2004; Bejarano González *et al.*, 2009). En nuestro país, en el año 2011 se dio conocer la prohibición de importaciones de ENDO y de sus productos formulados, a partir de julio de 2012. En tanto que la elaboración, formulación, comercialización y uso del este principio activo fue prohibida recién a partir de julio de 2013. Durante ese período, el SENASA emitió un permiso para la utilización de los formulados registrados hasta ese momento, de manera de realizar una supresión progresiva del uso de este principio, y que, en caso de quedar un remanente declarado, debiera ser reexportado o destruido (Resol. 511/2011; SENASA, 2011). No obstante, otros principios activos fueron reemplazando al ENDO en el mercado entre ellos el clorpirifós, el metamidofos, la CIP, la lambdacialotrina, la alfameina, la deltametrina y la permetrina (Villaamil Lepori *et al.*, 2013). Cabe comentar que, dada la clasificación toxicológica y la acción de estos sustitutos sobre peces, aves y abejas, se puede afirmar que poco se gana con el cambio (Bonansea *et al.*, 2017; Martin-Culma y Arenas-Suárez, 2018; Smits y Naidoo, 2018).

Se lo considera como contaminante ambiental por su tendencia a volatilizarse luego de tomar contacto con las plantas, alejándose del lugar de aplicación. Otro factor que interviene es la deriva que, dependiendo de las condiciones climáticas, le permiten a éste y a otros plaguicidas dispersarse hacia lugares muy alejados. Por este motivo, una cierta concentración de ENDO fue encontrada hasta lugares remotos como el Ártico (Menezes *et al.*, 2017).

El ENDO tiene una persistencia alta en el suelo con una vida media de 60 días para el isómero alfa y 800 días para el isómero beta, aunque puede persistir más tiempo bajo condiciones de mayor acidez (Quijano, 2000). En el agua exhibe una vida media muy variable que, en regiones tropicales va del orden de horas a días (Singh *et al.*, 1991), y en climas templados se extiende a meses (Barrett y Jaward, 2012). Esto depende, entre otros factores, del contenido de oxígeno, el pH, la turbidez y la

presencia de otros contaminantes (Hii *et al.*, 2007). El ENDO puede descomponerse por fotólisis, hidrólisis y biodegradación. En el ambiente (suelo o agua), ambos isómeros pueden degradarse lentamente en sulfato de ENDO y luego en otros metabolitos como ión clorado, ENDO diol, éter de ENDO, ENDO lactona, ENDO diol monosulfato, 2 heptanona, dieldrina y propionato de metilo (Mudhoo *et al.*, 2018). El primero es el principal producto de la degradación de ambos isómeros por vía de oxidación (Zaffar *et al.*, 2018), considerado más tóxico y persistente que su parentales (Weber *et al.*, 2010). La biodegradación de este insecticida en el suelo natural ocurre por la acción de hongos y bacterias (Kong *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2018). Debido a que el ENDO presenta un alto Kow y una alta solubilidad en grasas, tiende a acumularse en el tejido graso de los organismos y bioacumularse a lo largo de la cadena alimenticia del ecosistema en el que se halla involucrado (Mudhoo *et al.*, 2018). Es así que se han encontrado residuos en muestras de leche y agua (Nath *et al.*, 2013), en algunos vegetales y frutas (Bamigboye *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Unnisa, 2019), y en tejidos humanos (Cerrillo *et al.*, 2005), representando un riesgo importante de exposición para la salud humana. La OMS ha establecido un límite máximo de 20 µg/L de ENDO para el agua potable y la EPA, en el año 2002, estableció un máximo permisible de 74 µg/L para lagos, ríos y arroyos (Gupta y Ali, 2008).

1.1.1.5.2. Mecanismos de acción

El ENDO es principalmente neurotóxico, ejerce su acción en el cerebro por interacción antagonica con el sitio receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA). Esta interacción permite la apertura de los canales de cloro y la migración de los iones de cloro a favor del gradiente de concentración, provocando la hiperpolarización de la membrana neuronal (Barrett y Jaward, 2012). El bloqueo de la recepción del neurotransmisor GABA produce una repolarización parcial de la neurona, generando un estado de excitación no controlada en el sistema nervioso central (Silva y Beauvais, 2010). Los síntomas del sistema nervioso central en animales envenenados por ciclodienos incluyen temblores, convulsiones y ataxia. Tiene propiedades estrogénicas comparables a las de DDT, debido a la similar conformación de los sitios de unión al receptor de hormonas esteroideas de origen natural, por lo que

compite con el estradiol para unirse a los receptores de estrógeno e inhibe de este modo la función hormonal (Grunfeld y Bonefeld-Jorgensen, 2004; Mrema *et al.*, 2013).

1.1.1.5.3. Toxicidad

De acuerdo a su toxicidad aguda, el ENDO es un insecticida de clase II considerado moderadamente tóxico según la OMS, mientras que la USEPA lo clasificó como producto muy peligroso dentro del grupo Ib, y como un plaguicida de uso restringido (EXTOXNET, 1996b). Es muy tóxico para prácticamente todo tipo de organismos según la Unión Europea. En mamíferos, es altamente tóxico por vía oral con variaciones según el sexo, y moderadamente tóxico por vía de inhalación en ratas con una DL₅₀ de 10 mg/kg a 160 mg/kg. Se han registrado intoxicaciones masivas por ENDO en diferentes países de Latinoamérica, entre ellos Argentina (Bejarano González *et al.*, 2009).

El ENDO empieza a ejercer sus efectos visibles sobre los vertebrados e invertebrados acuáticos aún en concentraciones tan bajas como 5µg/L (Betancur *et al.*, 2015). Este químico es considerado un disruptor endócrino ya que interfiere con la síntesis de hormonas prolactina, luteinizante y estimulante de la tiroides (Caride *et al.*, 2010), daña el sistema reproductivo masculino al afectar la calidad del semen y retrasa la madurez sexual (Pandey *et al.*, 1990; Saiyed *et al.*, 2003; Barrett y Jaward, 2012), y puede inhibir la migración de los leucocitos y los macrófagos, causando efectos adversos sobre el sistema inmunológico humoral y de mediación celular (Sang y Petrovic, 1999). Tiene capacidad para alterar el material genético, especialmente los cromosomas de tejidos de mamíferos causando aberraciones cromosómicas (Chowdhuri *et al.*, 2001). En relación a ello hay evidencias de que es mutagénico, clastogénico y que provoca efectos en la cinética del ciclo celular (Quijano, 2000). La bibliografía provee numerosas evidencias sobre los efectos a corto y largo plazo del ENDO en cultivos de células (Guo *et al.*, 2015), animales de laboratorios (Choudhary *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2016), en especies silvestres (López González *et al.*, 2017, 2019; Burella *et al.*, 2018), así como en poblaciones humanas expuestas (Embrandiri *et al.*, 2012; Sreekumar y Prathapan, 2013). No obstante, el organoclorado aún no fue clasificado por la IARC como carcinogénico. Son muy

variadas y de diversa índole las relaciones entre distintas patologías humanas y exposición a ENDO. Ciertos estudios evaluaron la hipótesis de que la residencia de mujeres en período de gestación cerca de áreas donde se aplican plaguicidas organoclorados podría generar trastornos en el desarrollo de los niños, como ser el autismo (Roberts *et al.*, 2007) y retraso de la pubertad (Saiyed *et al.*, 2003). Por otro lado, se encontró relación potencial entre cáncer hematológico en niños con elevados niveles de ENDO en la médula ósea (Rau *et al.*, 2012), y de manera indirecta se propuso al ENDO como posible causa de criptorquidia congénita en humanos (Damgaard *et al.*, 2006). Es sabido que los desarrollos neoplásicos son de origen multifactorial en más de la predisposición individual, por lo cual asignar al ENDO un rol directo en el origen de patologías tan diversas es sumamente arriesgado. Este ha sido un breve relevamiento de parte de la literatura de los últimos 15 años.

1.1.2. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DEL USO MASIVO DE PLAGUICIDAS EN ARGENTINA

A nivel global Argentina es uno de los territorios de mayor diversidad geográfica y de mayor riqueza en recursos naturales. Con una extensión de 2,8 millones de km², nuestro país cuenta con tierras extraordinariamente fértiles ubicadas principalmente en la región pampeana que, cubriendo unas 9 mil hectáreas, se ajustan perfectamente a la producción agrícola. Esta área representa una de las mayores regiones agroproductivas en el mundo (Pengue, 2004; Schaaf, 2013). La región pampeana se ubica fitogeográficamente dentro de la Región Neotropical, Dominio Chaqueño, Provincia Pampeana, comprendiendo parte de Brasil, Uruguay y Argentina. En ésta última, abarca el sudeste de la provincia de Entre Ríos, el sur de la provincia de Santa Fe, centro-este de la provincia de Córdoba, el noreste de La Pampa y centro-norte de la provincia de Buenos Aires (Cabrera, 1976).

Hasta los años setenta el modelo de producción dominante en la Argentina era una alternancia entre la ganadería y la agricultura, para trabajar unas pocas hectáreas de unidades productivas en Santa Fe, Córdoba y norte de Buenos Aires (Pengue, 2001). Posteriormente, ese modelo se focalizó en el sistema agrícola basado principalmente en la técnica de siembra directa de cultivos con semillas genéticamente modificadas de soja, maíz y algodón, y un nuevo paquete de variados insumos basados en herbicidas y fertilizantes que asegurarían la cosecha y aumentarían la eficiencia productiva. Estas

semillas modificadas genéticamente, han sido manipuladas para soportar las aplicaciones masivas del herbicida GLIF, con lo cual es el principal formulado más comercializado en la Argentina. Desde su implementación, la producción de soja transgénica creció exponencialmente, lo que estimuló la expansión territorial más allá de la región pampeana, hacia otras regiones del país con características climáticas diferentes (Fig. 1.4).

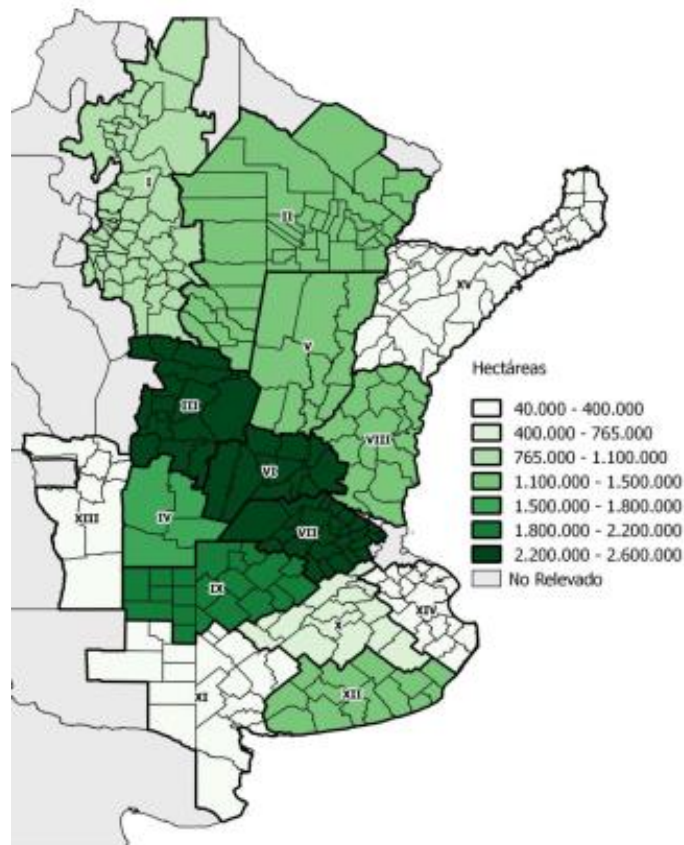


Figura 1.4. Mapa de distribución geográfica del área sembrada con soja (ha) en Argentina hasta la campaña 2017/2018. Fuente: Depto. Estimaciones Agrícolas, Bolsa de Cereales de Buenos Aires (2018).

Esto implicó la habilitación de nuevas tierras aptas para la agricultura, promoviendo el desmonte de bosques nativos, praderas o pastizales que antes eran utilizados para el pastoreo, con la consiguiente degradación del hábitat, el drenaje de los humedales, la pérdida de biodiversidad y la erosión hídrica, entre otros (Zak *et al.*, 2008; Viglizzo *et al.*, 2011; Vazquez y Zulaica, 2013). Este proceso de expansión fue impulsado por un importante incremento en la demanda global principalmente como alimento para la cría de animales en países asiáticos y la Unión Europea. Los

aumentos de la superficie sembrada y el rendimiento en esta etapa fueron logrados por medio de doble cultivo (soja de 1° y 2° ciclo).

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina, la superficie sembrada con soja en la campaña 2017/2018 fue de más de 17 millones de hectáreas, lo que significó una producción de más de 37 millones de toneladas. De las seis provincias con mayor producción de soja, Santa Fe constituye una de las más significativas productoras agrícolas del país, ocupando el tercer puesto con una producción de casi 7 millones de toneladas (en una superficie de 3 millones de hectáreas) que representa el 18,13% de la producción nacional (MAGyP, 2019a). La soja es muy utilizada para la producción de biodiesel y la Argentina es el cuarto país productor, así como el primer exportador (Barral *et al.*, 2013) y tercer proveedor mundial de granos de oleaginosa (FAO, 2013). En los últimos años se registraron altos rendimientos en la producción no sólo de soja sino también de maíz y trigo (Viglizzo y Frank, 2006), siendo estos los cultivos actuales de mayor importancia, mientras que el girasol, sorgo y alfalfa pasaron a serlo en menor medida. El sustento de este agronegocio ha generado una demanda de más de 114 millones de litros de formulaciones comerciales a base de GLIF para una producción de 50 millones de toneladas solo de soja (Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 2019). Para el año 2015, hubo un incremento del 9,54 % en el volumen de GLIF comercializado, que se debe a un aumento de la superficie sembrada con trigo y maíz y a la problemática de malezas resistentes, lo cual está exigiendo la utilización conjunta de otros PA para su control. Los insecticidas, en cambio, mostraron una caída del 2,64 % en el volumen comercializado respecto del año anterior (CASAFE, 2018). El control de plagas y enfermedades en los cultivos implica también el uso de otros formulados insecticidas como clorpirifós, flubendiamide y clorantraniliprole, rynaxypyr, fipronil y CIP, entre otros, seguido por el uso de fungicidas y, en menor medida, los curasemillas y acaricidas (CASAFE, 2012; Villaamil Lepori *et al.*, 2013).

Si bien el mayor porcentaje se emplea en actividades agrícolas, el 10% de la producción total de plaguicidas a nivel mundial se utiliza en actividades de salud pública para el control de enfermedades transmitidas por vectores como la malaria, la enfermedad de Chagas o el dengue (Chen *et al.*, 2011;

Qu *et al.*, 2011). Estos porcentajes representan una fuente importante de ingreso de plaguicidas en el ambiente y la preocupación actual es la peligrosidad que estos implican para la flora y fauna autóctonas, así como para la población humana. La disponibilidad de los plaguicidas está asociada a la volatilización, lixiviación a las capas más profundas del suelo o al escurrimiento hacia cuerpos de agua. En algunos casos, los plaguicidas pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas, posibilitando el traslado hacia las partes aéreas de las mismas (Mo *et al.*, 2008) y luego su liberación en el ambiente.

Es sabido que los plaguicidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, no obstante, la fabricación involucra otras sustancias que acompañan a los principios activos en los formulados que se comercializan, evidenciando que las exposiciones a las formulaciones son más perjudiciales, en muchos casos, que el daño ocasionado por los principios activos propiamente dichos (Larramendy *et al.*, 2014). El uso de plaguicidas en cantidades desmedidas como las combinaciones que se suelen hacer ha causado innumerables efectos no deseados a nivel ecosistémico y en la biodiversidad, motivo actual de gran preocupación en particular teniendo en cuenta las posibles consecuencias a nivel del flujo de genes (Dong *et al.*, 2016). Entre tantos, podemos mencionar parte de lo observado en algunos organismos con desarrollo de resistencia contra herbicidas e insecticidas de amplio espectro, evolución de patógenos, plagas y supermalezas, y cambios en la diversidad genética (Tsatsakis *et al.*, 2017). Además, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de casi todos los compartimentos del ambiente conlleva la perturbación de los ecosistemas con degradación y disminución de la biodiversidad de flora y fauna autóctonas en distintas regiones de nuestro país (González *et al.*, 2008). En este sentido, se han encontrado efectos negativos en las comunidades de organismos de la mesofauna del suelo que interviene en la descomposición de la materia orgánica, como ser los ácaros (Arolfo *et al.*, 2010) y en comunidades microbianas de un mesocosmo tratado con un herbicida a base de GLIF que mostraron efectos directos e indirectos sobre la abundancia de bacterioplancton, picocyanobacteria planctónica y concentración de clorofila en la columna de agua (Vera *et al.*, 2012), favoreciendo la aparición de

plagas emergentes (Carmona, 2001). El trabajo reciente de Peluso *et al.* (2019) demostró efectos adversos del GLIF en el metabolismo en los organismos del perifiton en ausencia de mejillones *Limnoperma fortunei*, induciendo estrés oxidativo. Y en ausencia de estos organismos no observaron cambios, lo que sugiere que los mejillones atenuaron los efectos del herbicida, contribuyendo a la disipación del mismo. La exposición del perifiton a la mezcla de herbicidas mostró más resistencia que el fitoplancton (Lozano *et al.*, 2018). El uso de agentes anticolinesterasas supone una amenaza de infecciones, brotes de enfermedades y mayor mortalidad de organismos vulnerables (Köhler y Triebkorn, 2013). Otros efectos indirectos ocurren a nivel de las redes tróficas y en la competencia interespecífica entre las poblaciones, donde los herbicidas son los principales responsables de la reducción de disponibilidad de alimentos para invertebrados y vertebrados, afectando así a la abundancia y la diversidad de especies que habitan esos ambientes, lo que condujo incluso a cambios en las interacciones depredadores-presas (Vera *et al.*, 2010; Di Fiori *et al.*, 2012). Asimismo, hay literatura que sostiene que el calentamiento global influirá en la potencia de los plaguicidas, el 83% de los estudios ecotoxicológicos han puesto de manifiesto la acción sinérgica entre estos factores (Holmstrup *et al.*, 2010).

En el caso particular de endosulfán, su utilización fue muy cuestionada por años debido a las consecuencias en los ecosistemas y en la salud de las personas en todo el mundo (Souza Casadinho, 2009; Miglioranza *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2014) Si bien ha sido prohibido por los organismos internacionales, aún se continúa usando en algunos países y su dispersión hacia otras regiones lo convierte en un problema global. En nuestro país, un fallo del Poder Judicial de la ciudad de Córdoba respecto de las fumigaciones con GLIF y endosulfán en el barrio de Ituzaingó de esta ciudad, impulsó la formación de una Comisión Nacional de Investigación de Agroquímicos (CNIA) en el año 2009 bajo la dependencia del Ministerio de Salud de la Nación para la recepción de denuncias pertinentes a esta problemática nacional. Según la Auditoría General de la Nación “no se tuvo evidencias de avances de la CNIA posteriores a 2010” (Rodríguez, 2013). En Julio de 2011, el SENASA reconoció las

consecuencias nocivas del uso del endosulfán y prohibió su ingreso al país a partir del 2012 y el uso de los productos formulados a partir de 2013 (Res. 011/2011; SENASA, 2011).

Además de las publicaciones científicas en torno a esta problemática, en nuestro país existen numerosas denuncias sobre fumigaciones y sus consecuencias, las cuales son abordadas por diversas ONGs y grupos ambientalistas (Paren de fumigar, Red de abogados de pueblos fumigados) en oposición a este tipo de prácticas agrícolas. En una de las provincias más afectadas, Córdoba, se evidenció una alta prevalencia de síntomas relacionados con la tarea del mezclado y/o la aplicación de plaguicidas, así como las tasas elevadas de consulta médica y hospitalización por este tipo de exposición (Butinof *et al.*, 2015). En este sentido, es importante remarcar que la actividad laboral constituye una fuente significativa de exposición a plaguicidas tanto en trabajadores agrícolas y sus familias, como en trabajadores de la industria química, incluyendo todos aquellos que formulan, manufacturan, mezclan, transportan, cargan, almacenan o aplican plaguicidas. Aunque los períodos de contacto con los químicos son relativamente cortos en cada jornada laboral, se dan de manera repetida en períodos prolongados en el tiempo. La principal vía de ingreso de los plaguicidas en los aplicadores es la absorción dérmica, debido a que generalmente, las personas que realizan las tareas de fumigación en el campo no utilizan elementos de protección recomendados. En la población en general, expuesta ambientalmente, la vía de ingreso más importante es por ingestión de alimentos y agua contaminada (Akoto *et al.*, 2015), mientras que la vía respiratoria es la segunda en importancia. Debe tenerse en cuenta que las aplicaciones más frecuentes, hasta hace unos años, se realizaban de forma aérea y, si bien fueron reemplazadas por aplicaciones terrestres por medio de máquinas pulverizadoras, con la influencia del viento, la deriva ejerce una función importante de arrastre hacia zonas aledañas de cultivos. A esto se suma la poca distancia que existe, en muchos casos en la provincia de Santa Fe, por ejemplo, entre las parcelas cultivadas y los hogares de muchas familias que quedaron atrapadas en un territorio que fue desmontado para desarrollo de este tipo de práctica agroeconómica.

El monitoreo de efectos no deseados en relación con esta problemática ambiental en poblaciones humanas en nuestro país es relativamente escaso. Algunos de los estudios realizados fueron en personas adultas que vivían en las cercanías y/o trabajaban en campos agrícolas. Por ejemplo, estudios realizados en la provincia de Córdoba describieron alta incidencia de daño al ADN relacionado con la inhalación y/o absorción dérmica de plaguicidas en trabajadores rurales (Mañas *et al.*, 2009; Peralta *et al.*, 2011). Otro estudio en población infantil detectó que el 40% de los niños que vivían a menos de 500 m de zonas de exposición a pulverizaciones de plaguicidas mostraron un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos respecto de los niños que residían a más de 1500 m de distancia y manifestaban algún tipo de afección persistente (Bernardi *et al.*, 2015). En trabajadores frutihortícolas de la provincia de Santa Fe se han detectado modificaciones en el balance oxidante y daño al ADN (Simoniello *et al.*, 2010; Astiz *et al.*, 2011). Estudios realizados en placenta humana indican que los plaguicidas llegan a la placenta y provocan alteraciones que pueden afectar la salud fetal o infantil, así como la regulación de las enzimas implicadas en la reparación de tejidos (Ridano *et al.*, 2012; Vera *et al.*, 2012; Bulgaroni *et al.*, 2013). Otro ejemplo de posible asociación entre exposición y daño no deseado se observa en los adolescentes de zonas de mayor exposición ambiental a plaguicidas en la provincia de Jujuy, quienes mostraron diferencias en la memoria a corto plazo y en la codificación de las percepciones visuales, asignable por los investigadores a un efecto temprano del plaguicida sobre el cerebro aún inmaduro de los adolescentes (Martos Mula, 2005).

1.1.3. BIOMARCADORES Y MONITOREO AMBIENTAL

La situación actual de riesgo de exposición por uso indiscriminado de plaguicidas que vive nuestro país como la mayoría de los países con este tipo de prácticas agrícolas, conlleva a implementar actividades de monitoreo de las poblaciones expuestas, tanto humanas como de diferentes especies silvestres. Esto permite informar cuándo la exposición constituye un riesgo para la salud pública y ambiental y ayuda a preservar la salud y la calidad de vida de los grupos expuestos (Aiassa *et al.*, 2014). El monitoreo ambiental es indicativo de un estado de alerta temprana y pone en evidencia los

daños causados al momento de la exposición o incluso permite visualizar posibles daños a futuro, por lo que no sólo tiene un valor diagnóstico sino también pronóstico (Wu *et al.*, 2001). Por lo antes referido, el monitoreo debe involucrar al agente en evaluación, los organismos blanco de su efecto y el ambiente en su conjunto.

1.1.3.1. Tipos de biomarcadores

El término “biomarcador” fue establecido por el National Research Council (NRC) de Estados Unidos en el año 1987. Inicialmente, fueron reconocidos como cambios biológicos observables en los individuos y luego se extendió su alcance a la evaluación de las poblaciones o comunidades. Los biomarcadores han sido definidos como eventos de señalización en los sistemas biológicos o cambios a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico, histológico o de comportamiento que pueden ser cuantificados como la respuesta del organismo a la exposición ante un agente determinado, ya sea químico, físico, biológico u otro (Gupta, 2014). La medición de los biomarcadores refleja el curso del tiempo en la generación de una lesión y proporciona información sobre los mecanismos moleculares de toxicidad implicados. La relevancia de un biomarcador es un punto importante a tener en cuenta, y debe ser elegido de acuerdo a su sensibilidad, especificidad y en relación con los procesos de toxicidad (Sogorb *et al.*, 2014). Siguiendo esta definición, los marcadores pueden ser agrupados en: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad.

1.1.3.2. Biomarcadores de exposición

Son aquellos que señalan la presencia de una sustancia exógena o de sus metabolitos y que puede ser medido dentro de un compartimento del organismo, sin que los cambios mencionados anteriormente conlleven a afectar la fisiología normal y el desempeño del organismo en sus actividades habituales (Carballo y Mudry, 2006). Por lo que este tipo de biomarcador se puede utilizar en cualquier momento después de la absorción del xenobiótico (Aldridge, 1996) y comprende mediciones de la cantidad de la sustancia, sus metabolitos o el producto de la interacción entre la sustancia y alguna molécula del organismo en muestras apropiadas como sangre, suero u orina.

Desde el punto de vista predictivo, este tipo de biomarcadores resultan los mejores para establecer alertas tempranas. Cuanto mayor distancia exista (en términos de concentración aplicada o de tiempo de exposición a contaminantes) entre el biomarcador de exposición y el efecto deletéreo, mayor será el margen con que se cuenta para intentar remediar o revertir el potencial peligro que entraña la presencia de tal o cual contaminante (Rodríguez, 2006).

1.1.3.3. Biomarcadores de susceptibilidad

Estos biomarcadores son indicadores de la particular sensibilidad o resistencia del organismo a los efectos inducidos por un compuesto exógeno específico o a un grupo de componentes como ser una mezcla compleja de químicos. Estos biomarcadores son determinados genéticamente y afectan a cualquier punto de la biodisponibilidad (absorción, distribución, metabolización o detoxificación). El papel de la enzima paraoxonasa (hidroliza el paraoxón) es un ejemplo de este tipo de biomarcador a nivel de especies diferentes, como ser los mamíferos que manifiestan niveles más altos de actividad paraoxonasa y son más resistentes a los efectos tóxicos de los insecticidas organofosforados que las aves e insectos, que son susceptibles al expresar niveles más bajos de esta enzima (Sogorb y Vilanova, 2002).

1.1.3.4. Biomarcadores de efecto

Este biomarcador es un indicador de la alteración bioquímica, fisiológica o genética como resultado de la exposición a un agente exógeno, y que, dependiendo de la magnitud, se traduce en un daño o una enfermedad potencial o ya establecida, comprometiendo el desarrollo del organismo. Estos marcadores pueden ser considerados como específicos cuando indican un efecto biológico ante una exposición particular y, no específicos, en el caso de evidenciar un efecto integral que pudo producirse debido a múltiples exposiciones (NRC, 1991; Mudry y Carballo, 2006). Un ejemplo es un síndrome neurodegenerativo causado por ciertos insecticidas organofosforados que provocan polineuropatía retardada (Glynn, 2003).

En general, la diferencia entre un biomarcador de efecto y uno de exposición no siempre está muy clara por lo que es importante remarcarla. Los biomarcadores de exposición indican el ingreso de un tóxico al organismo producto de su contacto con el mismo, aunque el nivel de impacto en función del tiempo y la concentración del tóxico puede no ser suficiente aún para generar un daño, y su detección suele ocurrir dentro de la denominada “región fisiológica de adaptación” (Kleinow *et al.*, 1999). Superada esa región umbral comienzan a aparecer efectos claramente adversos para el organismo, que pueden identificarse mediante biomarcadores de efecto (Rodríguez, 2006). La interacción de un contaminante con moléculas biológicas tales como proteínas y ácidos nucleicos resultan, a menudo, en conjugados o aductos (Timbrell, 2009). Para evaluar el alcance del efecto adverso a nivel genético se utilizan biomarcadores de efecto denominados “**biomarcadores de genotoxicidad**”. Estos buscan evaluar si una alteración en el material genético se traduce en una mutación cuando son inducidas por agentes biológicos, químicos, físicos u otros, de manera opuesta a lo que sucede en la dinámica poblacional donde los cambios estructurales en los genes conducen a la diversidad biológica. En este sentido, la Genética Toxicológica (una disciplina relativamente nueva) abarca el estudio de una amplia variedad de puntos finales de daño al ADN, que incluyen mutagenicidad, clastogenicidad, aneugenicidad, entre otros (Stice *et al.*, 2019). Es importante distinguir los conceptos de genotoxicidad y mutagenicidad porque tienden a ser confundidos. Por un lado, la genotoxicidad cubre un amplio espectro de puntos finales, mayor a lo que se refiere la mutagenicidad. Por ejemplo, la síntesis de ADN no programada, intercambios de cromátidas hermanas, y rupturas de cadena de ADN son medidas de genotoxicidad y no de mutagenicidad, porque las lesiones de este tipo no son transmisibles de célula a célula o de generación en generación. Mutagenicidad, por el contrario, se refiere a la producción de alteraciones en la estructura de la molécula de ADN (mutaciones), por lo tanto, son hereditarias y pueden tener un efecto adverso permanente o duradero en la salud de un organismo (Preston y Hoffmann, 2008; Stice *et al.*, 2019). Estas mutaciones pueden producirse en dos regiones, las codificantes (por ej., genes) y las no codificantes (por ej., regiones reguladoras de los genes), alterando los patrones de expresión génica

en la formación de proteínas en células somáticas o germinales. No todas las mutaciones en la región de codificación conducen a efectos adversos (Stice *et al.*, 2019). Los cambios en los gametos de un individuo portador pueden provocar esterilidad o bien pueden traducirse en cambios heredables, mientras que en células somáticas puede producirse el desarrollo de distintas patologías o el inicio de un proceso tumoral, que se denomina “carcinogénesis”. Si esos cambios genéticos ocurren durante el desarrollo embrionario o embriogénesis, conducen a alteraciones en el embrión y se habla de “teratogénesis” (Mudry y Carballo, 2006). La incapacidad del organismo para hacer frente a este estrés y para mantener la integridad estructural y funcional del ADN brinda al investigador la oportunidad de probar la gravedad de la exposición y utilizar diversos eventos como biomarcadores que permiten evaluar la genotoxicidad de los agentes en el ambiente (Novillo *et al.*, 2006). Ciertos agentes, con especial atención a los plaguicidas, aparecen bajo la lupa de los investigadores por el posible daño genotóxico que se les adjudica ante su aplicación. Para esto es necesario una adecuada elección del biomarcadores que pongan en evidencia el modo de actuar no deseado (Carballo y Mudry, 2006), así como la identificación de los individuos y/o distintas especies sensibles que se encuentran en mayor riesgo de exposición. Se han desarrollado y estandarizado una variedad de ensayos para llevar a cabo el monitoreo genotóxico y en pos de lograr una mayor precisión se considera que se debe utilizar una batería con más de dos métodos con el objeto de aumentar la sensibilidad y la especificidad (Ramírez y Lacasaña, 2001; Sogorbe *et al.*, 2014). Estos ensayos pueden ser *in vitro*, *in vivo* e *in silico*, y se agrupan de acuerdo al tiempo que lleva la determinación del efecto adverso (Stice *et al.*, 2019). Los ensayos de *Corto Plazo*, no superan los tres meses y son frecuentemente usados para evaluar el riesgo de mutagénesis o teratogénesis, mediante una rápida detección de los posibles efectos no deseados. Estos biomarcadores permiten detectar un nivel de daño que todavía es reversible (Bonassi y Au, 2002). Por su parte, los ensayos de *Largo Plazo* se aplican para estudiar procesos de carcinogénesis con un seguimiento a partir de los 90 días hasta más allá de los 5 años (Carballo y Mudry, 2006) y que están considerados como irreversibles. Todos estos conceptos integran el campo de la Genética Toxicológica, que busca evaluar el daño al material

genético y los mecanismos asociados mediante una batería de ensayos, y caracterizar el agente en estudio a diferentes niveles de complejidad, en general de manera creciente, ya que comprenden desde estudios a nivel molecular hasta poblacional. Los detalles completos sobre la realización de estos ensayos pueden obtenerse accediendo a las directrices de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE; <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing>).

1.1.3.5. Niveles de análisis del daño genotóxico

Si hablamos de niveles de complejidad creciente cabe explicar que el **nivel primario** es conocido como bacteriano o molecular y es el que permite la detección de mutaciones puntuales en procariotas, pero se incluye también la detección en levaduras. Si bien uno de los principales ensayos es el Test de Ames, existen varios otros altamente informativos tales como el Ensayo de reversión a triptófano en *Escherichia coli*, Ensayo de sustitución de pares de bases específico en *Salmonella*, Mutatox (batería *Photobacterium phosphoreum*, cepa M169), Vitotox (recombinantes de *Salmonella typhimurum*), entre otros. El **nivel secundario** involucra el estudio de los efectos a nivel tisular, en cultivos de células ya sea en monocapa (CHO, Hela, entre otros) o en suspensión (linfocitos de sangre periférica) para caracterizar el daño genético en líneas celulares establecidas o en distintos fluidos corporales puestos a cultivar o en estudios directos, por lo que se considera el nivel de estudio “*in vitro*”. Entre los ensayos de este nivel que pueden aplicarse para detectar la potencial genotóxico de un agente dado, se encuentran la determinación de las Aberraciones Cromosómicas (AC), el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), del Retardo en Anafase (RA), el Ensayo de Micronúcleo (MN) y el Ensayo Cometa (EC) entre otros. El **nivel terciario** corresponde al nivel orgánico ya que todos los ensayos de este nivel utilizan el individuo entero, de manera de acceder a los productos metabólicos del compuesto en estudio. Es decir que se analizan los cambios en el organismo-individuo como un todo, por lo cual se denomina estudio “*in vivo*” y se puede aplicar en plantas, animales y el hombre. En este caso, se evalúan exposiciones de tipo laboral, ocupacional, accidental, medicamentosa, o experimental. Para este nivel se utilizan preferentemente los ensayos de MN, EC, AC, RA, SMART, entre otros. Por último, el **nivel cuaternario** es el nivel epidemiológico ya que utiliza

estudios de carácter prospectivo y/o retrospectivo analizando poblaciones expuestas en forma accidental, laboral o por estilos de vida (Carballo y Mudry, 2006; Fig. 1.5).

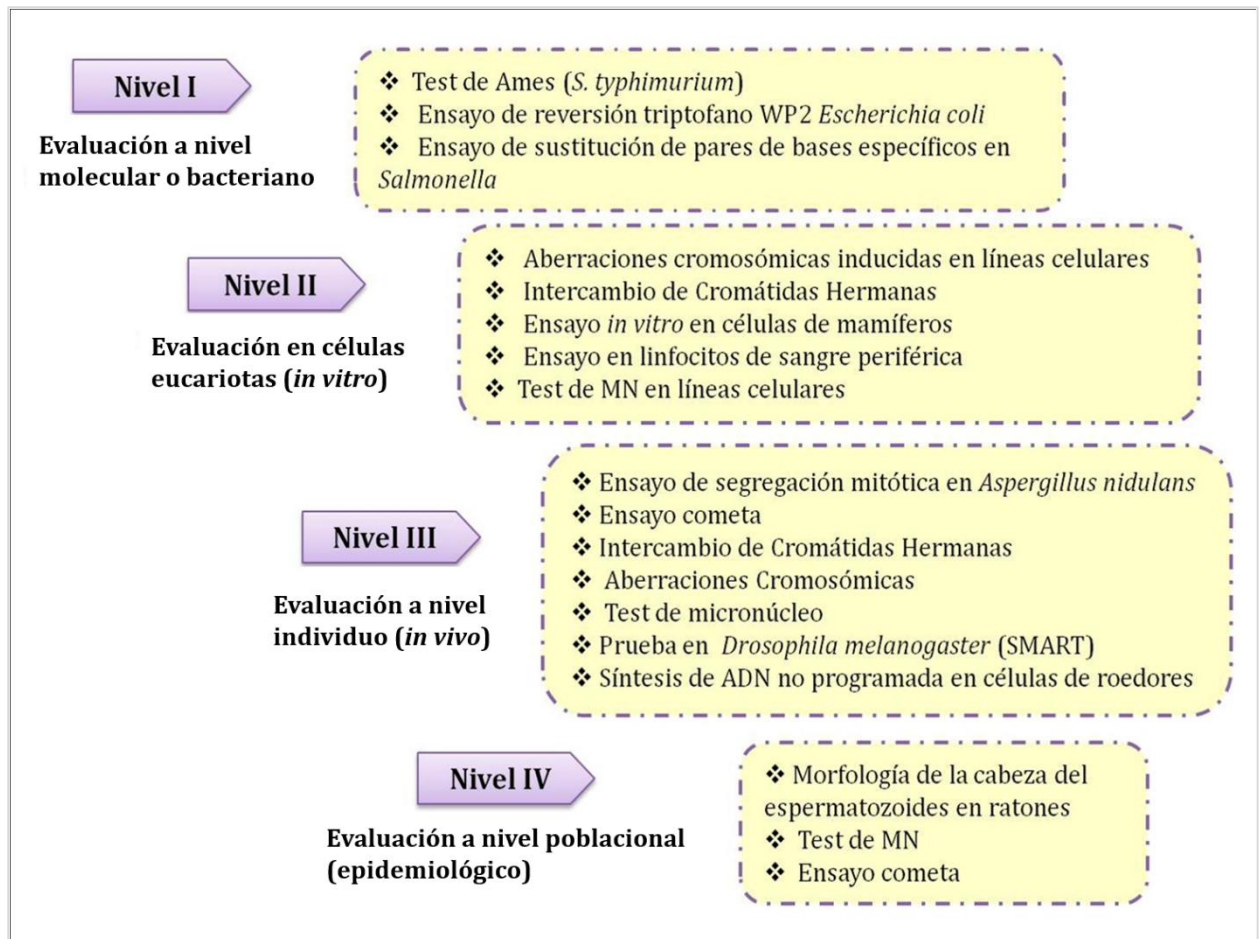


Figura 1.5. Diagrama de niveles de evaluación genotóxica. Modificado de Mudry y Carballo (2006).

Para llevar a cabo los planes de vigilancia del estado de salud del ambiente, los investigadores se focalizan en especies centinelas para detectar el impacto de los xenobióticos antes de que sea significativo en los ecosistemas y en la salud humana. Para ello, dichas especies deben cumplir con ciertos requisitos. En el caso particular de esta Tesis Doctoral, nos avocamos al estudio de una especie reptiliana, la iguana overa, considerándola como organismo centinela (Poletta *et al.* 2017) debido a que presenta las siguientes características:

- Tiene amplia distribución geográfica.

- Presenta abundancia en ambientes de diferentes tipos y un área reducida donde los individuos cumplen con sus funciones (alimentación, refugio, reproducción, entre otras).
- Tiene plasticidad para adaptarse a los ambientes perturbados, no perturbados, y a zonas periurbanas.
- Por su condición de ectotermia, posee un metabolismo no constante que puede influir en la capacidad de detoxificar compuestos químicos complejos como los plaguicidas.
- Eslabón importante en la red trófica entre invertebrados y aves rapaces y otros depredadores.

1.1.4. MODELO DE ESTUDIO: IGUANA OVERA

1.1.4.1. Características biológicas

Salvator es un género de grandes lagartos que pertenecen a la Familia *Teiidae* en el Orden *Squamata* (Clase *Reptilia*). Anteriormente las especies estaban incluidas en el género *Tupinambis*, hasta que se hizo una revisión de la sistemática de la Familia, llevada a cabo por Harvey *et al.* (2012). A partir de esa revisión basada en el ADN mitocondrial, los autores realizaron el reordenamiento de los taxa en géneros y subfamilias, e incorporaron nuevos géneros. Este estudio comprobó que el género *Tupinambis* es polifilético y, a partir de ello, el clado del norte y del sur (Fitzgerald *et al.*, 1999), fueron divididos en géneros diferentes. Al clado del sur se lo denominó *Salvator*, una sinonimia utilizada anteriormente ***Salvator*** Dumeril & Bibron, 1839. Esta denominación fue inspirada en el nombre común “Sauvegardes”, que significa protector o salvador en francés y usado por Cuvier y sus contemporáneos, especialmente en la literatura popular (Harvey *et al.*, 2012).

El género *Salvator* comprende tres especies: *S. merianae*, *S. rufescens* y *S. duseni*. En Argentina habitan las dos primeras, pero la más frecuente de encontrar por su amplia distribución geográfica es *S. merianae*, vulgarmente conocida como “iguana o lagarto overo” (Avila-Pires, 1995). Los individuos de esta especie tienen una longitud hocico-cloaca promedio de 65 cm y pueden llegar a

medir hasta 1,50 m de longitud total. Poseen 17 a 29 poros femorales y 2 precloacales a los laterales de la cloaca que se constituye como uno de los caracteres sexuales que permite distinguir a los machos de las hembras (Hall, 1978). El dimorfismo sexual es aún más evidente por el mayor desarrollo de la zona gular en los machos adultos, siendo más grandes y robustos que las hembras (Carreira *et al.*, 2005). Se caracterizan por una coloración verde brillante en la región de la cabeza y en el cuello de los neonatos que luego se pierde por completo en la adultez, llegando a ser de color negro con manchas blancas y tonalidades marrones (Fig. 1.6).

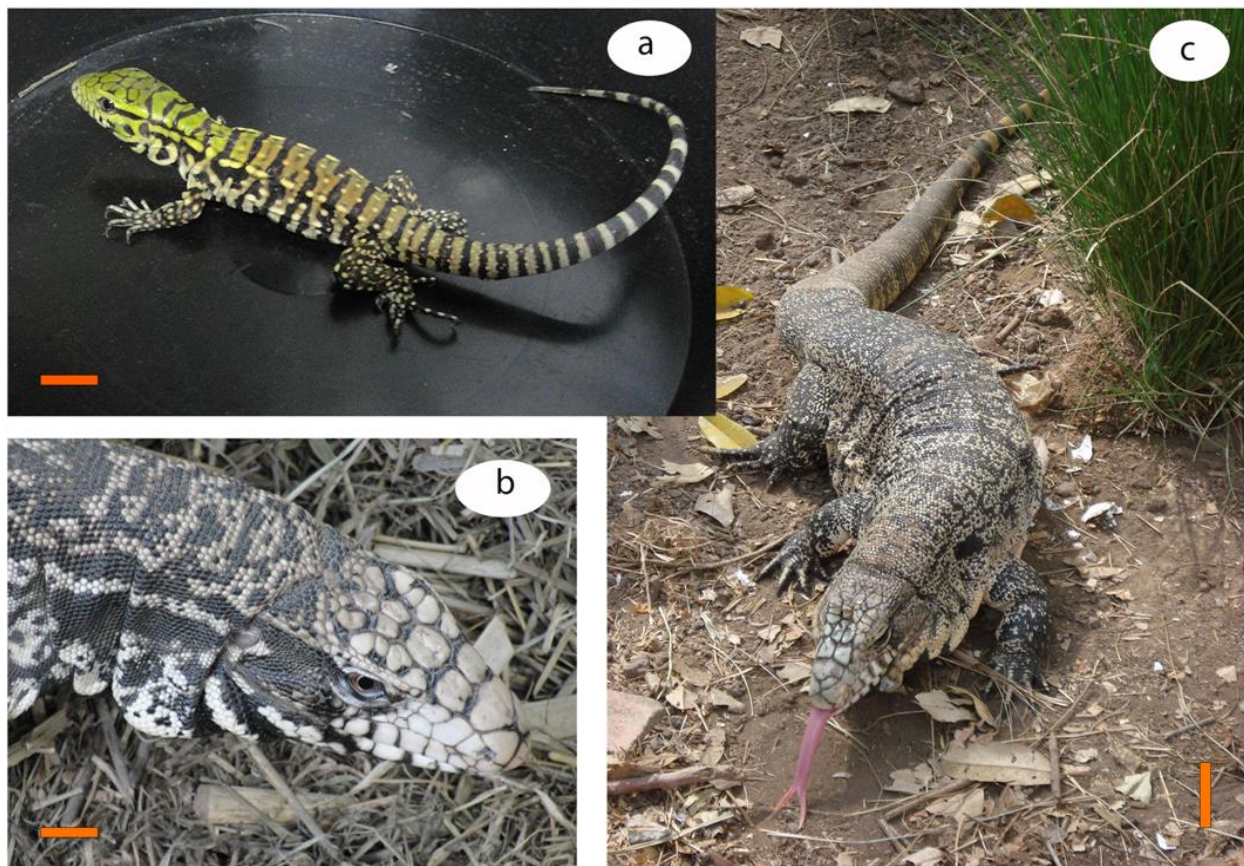


Figura 1.6. Individuos de *S. merianae* de tres edades diferentes donde se observa el cambio en el patrón de coloración del tegumento. Barra= a) 1cm, b) 2 cm, c) 8 cm. Fotos: a-b) L.G. Schaumburg, y c) P.A. Siroski.

Este cambio ontogenético en el patrón de coloración tiene que ver con la supervivencia de los individuos en el lugar donde habitan, dado que al momento de la eclosión los pichones tienen una

coloración verde semejante a la vegetación que les permite camuflarse en el ambiente y evadir así a los depredadores (Harvey *et al.*, 2012).

La iguana overa por muchos años fue un recurso valioso para las comunidades nativas de la región donde habita, quienes aprovechaban su cuero, carne, así como la grasa corporal, que por sus propiedades anti-inflamatorias era muy utilizada para enfermedades de la piel (Ferreira *et al.*, 2010). Sin embargo, en las últimas décadas, las poblaciones de las dos especies del género *Salvator* que habitan en nuestro país declinaron su densidad poblacional por la intensa comercialización del cuero, causando preocupación en la región.

A partir del año 1982, Argentina se adhiere a CITES (Convención Internacional para el Tráfico de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres), categorizándose todas las especies incluidas en la Convención. Es así que, desde entonces, las dos especies del género *Salvator* se encuentran en el Apéndice II, donde figuran aquellas especies que podrían llegar a estar en peligro de extinción, a menos que se controle estrictamente su comercio/explotación. Por otra parte, *S. merianae* fue incluida también en la Lista Roja de la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) a partir del 2010, bajo la categoría de “preocupación menor”.

En nuestro país como a nivel mundial, se implementaron programas de manejo para aquellas especies amenazadas con el objetivo de garantizar la preservación de las mismas. En una primera instancia, se creó un programa de caza comercial (en inglés *crooping*) de adultos de la iguana overa para la obtención de cueros con la participación de cazadores y acopiadores en las provincias de Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Santiago del Estero y Buenos Aires, conocido como “*Proyecto Tupinambis*”. Existe, además, la cría en cautiverio en granjas (en inglés *farming*) y un tercer tipo de manejo sustentable denominado “*ranching*” o rancheo que hasta hace unos 12 años en la provincia de Santa Fe sólo fue aplicado en el yacaré overo (*Caiman latirostris*). Este tipo de manejo consiste en la cosecha de huevos en los ambientes naturales de la especie en cuestión para la incubación artificial y posterior crianza de los animales bajo condiciones controladas. Una vez que los animales logran un tamaño adecuado, en la mayoría de los casos, se libera un número variable de

ejemplares en los sitios de recolección de los huevos y el resto se destina a circuito comercial (Larriera y Imhof, 2006). Este programa se habilitó para su implementación en la iguana overa bajo el nombre de “Proyecto Iguana” mediante la Resolución 031/07 de la Secretaria de Estado de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Provincia de Santa Fe, a partir del año 2007. Este y todos los programas de *ranching* en Argentina y en el exterior, se fundamentan en el factor crítico de la mortalidad de los animales. Es decir, que permiten el aprovechamiento de ejemplares que en condiciones naturales no tendrían posibilidades de supervivencia por la alta mortandad embrionaria y perinatal debido a condiciones ambientales extremas (inundaciones, bajas temperaturas en las estaciones frías luego de la eclosión de los neonatos), depredación de huevos y neonatos, sólo por citar algunas posibles causas (Larriera y Imhof, 2006).

1.1.4.2. Distribución geográfica

S. merianae es una especie endémica de Sudamérica que exhibe una amplia distribución geográfica comprendiendo los estados de Amazonas, Pará, Rio Grande do Sul, Maranhão, Pernambuco, Mato Grosso y Goiás en Brasil, este de Bolivia, Paraguay, Uruguay y el norte y centro de Argentina (Fig. 1.7), hasta el norte de la Patagonia en la provincia de Rio Negro (Fig. 1.8), incluyendo una variedad de climas tanto tropicales como fríos (Harvey *et al.*, 2012).

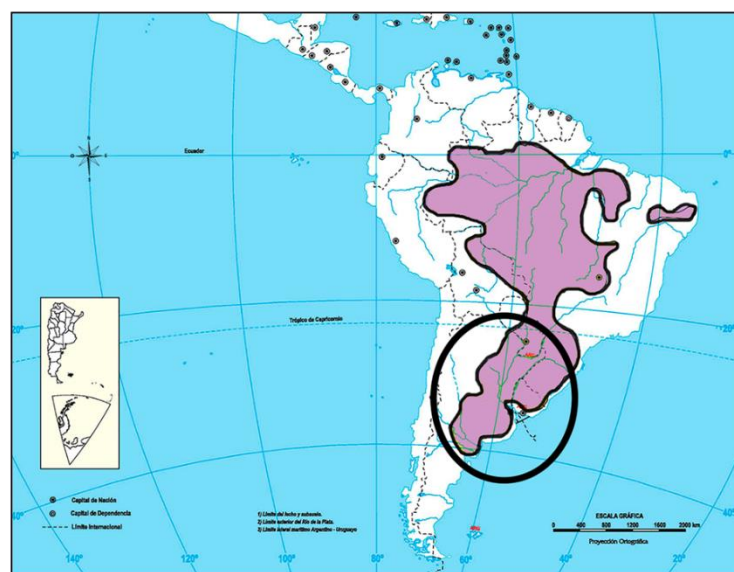


Figura 1.7. Área de distribución geográfica de *S. merianae* en América del Sur (Scott *et al.*,

2016).



Figura 1.8. Área de distribución de *S. merianae* en la Argentina. Extraído de Scott *et al.* (2016) y modificado por L.G. Schaumburg.

1.1.4.3. Ambiente, recursos y dieta

S. merianae se adapta a una variedad de ambientes, entre ellos, espacios abiertos del bosque primario y secundario, sabanas con arbustos espinosos, espacios cerrados como selvas húmedas tropicales, riveras de los ríos y zonas costeras arenosas. También se encuentra en hábitats perturbados, incluyendo bordes de caminos y zonas agrícolas. Los adultos de esta especie generalmente superan el metro de longitud y son cazadores activos con una alimentación generalista y oportunista. Su alimentación depende de la edad debido a un cambio ontogenético en la dentición (Gomes, 2015). Es decir, cuando son pequeños consumen insectos, arañas, caracoles y frutos carnosos, desempeñando así un papel importante en la dispersión de semillas (Castro y Galetti,

2004). Pero a medida que crecen, la dieta se amplía variando entre carroña, vertebrados pequeños, crías de gallinas y huevos tanto de su propia especie como de otras, incluyendo también plantas y raíces (Kiefer y Sazima, 2002; Silva *et al.*, 2014), y hasta hongos (Toledo *et al.*, 2004).

En cuanto a sus depredadores, las iguanas de gran tamaño (adultas) sólo pueden ser amenazadas por grandes mamíferos como grandes felinos y zorros, pero también por aves rapaces. Los juveniles de pequeño porte pueden ser predados por otras iguanas overas, serpientes, aves y mamíferos (Ávila-Pires, 1995; Röhe y Pinassi Antunes, 2008).

1.1.4.4. Ciclo de vida

La iguana overa se caracteriza por una longevidad entre 12 y 20 años (Duarte Varela y Cabrera, 2000), alcanzando la madurez sexual luego de cuatro años de vida en promedio. Una característica del ciclo vital es la producción de nidadas de tamaño relativamente grande que se asocia con una alta mortandad embrionaria y perinatal en los primeros meses de vida y una supervivencia variable de los juveniles (Quintana, 1991; Fitzgerald *et al.*, 1994). En este punto, es importante rescatar las definiciones respecto a las edades de estos animales ya que no es posible saber con exactitud la edad de los individuos en la naturaleza, es posible estimarla en forma aproximada a partir de la longitud hocico-cloaca (LHC). Yanosky y Mercolli (1992), pioneros en el estudio de la biología de la iguana overa, señalaron que los individuos hasta los 70 días de vida pueden ser considerados “**neonatos**”, luego de alcanzar los 11 cm y hasta los 25 cm de LHC se consideran como “**juveniles**”, los que se encuentran entre 25 y 29 cm de LHC son “**subadultos o preadultos**”, y como última categoría se encuentran los “**adultos**”, cuyos animales superan los 29 cm de LHC y muestran un comportamiento reproductivo indicativo de su madurez sexual.

En la mayoría de los reptiles el modo de reproducción predominante es la oviparidad, aunque en varios grupos hay una tendencia hacia la ovoviviparidad e incluso la viviparidad estricta (Shine, 1985). Entre las especies ovíparas se reconocen dos tipos básicos de huevos, uno es el cleidoico, de cáscara rígida característico en crocodilios y tortugas terrestres y, excepcionalmente, en gekónidos, y el otro tipo es el no-cleidoico, de cáscara flexible, característico de lepidosaurios (rincocéfalos,

lagartos y serpientes) y de tortugas acuáticas (Packard y Packard, 1988). En el caso de la iguana overa, es una especie ovípara que pone huevos no-cleidoicos una vez al año. La reproducción de esta iguana es un fenómeno cíclico caracterizado por una corta actividad sexual primaveral (Noriega *et al.*, 2002), que comienza a fines de agosto o principios de septiembre, con las primeras lluvias y temperaturas elevadas, que estimulan a los adultos a salir de sus madrigueras y comenzar con las actividades reproductivas, incluyendo el reinicio de las funciones gonadales en ambos sexos, apareamiento y formación de los huevos fértiles (Quintana, 1991; Noriega *et al.*, 2002). La iguana overa construye sus nidos en huecos hechos en la tierra, entre las raíces de árboles o en cuevas deshabitadas. El interior de los mismos es acondicionado cuidadosamente por la hembra que utiliza material vegetal o resto de tallos y hojarasca que obtiene de los alrededores del lugar donde eligió para construir su nido, de tal manera que pueda aislar al nido de los cambios climáticos bruscos (Fig. 1.9).



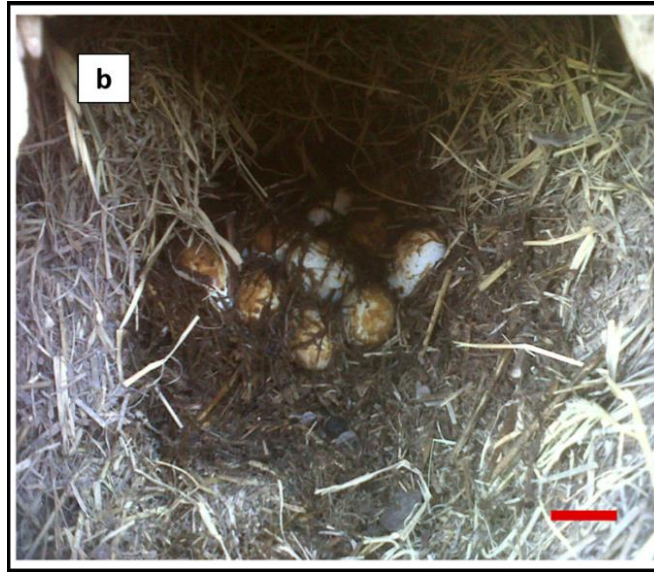


Figura 1.9. Nido de iguana overa hecho en la base del tronco de un árbol de paraíso (*Melia azedarach*). Se observa la entrada al nido (a; barra= 20 cm), y los huevos de la iguana overa en el lecho del nido rodeado por material vegetal húmedo (b; barra= 4 cm).

El aporte de humedad al nido se relaciona directamente con los requerimientos hídricos de los embriones, dado que los mismos necesitan absorber una cantidad considerable de agua durante la incubación para completar su desarrollo normal (Chani *et al.*, 1993; Yanosky y Mercolli, 1995b). La disponibilidad de agua es fundamental al inicio del período de incubación por la mayor sensibilidad de los embriones, lo cual depende también de la periodicidad de las lluvias en esos meses críticos (noviembre-diciembre; Yanosky y Mercolli, 1995b). En un estudio realizado en el lecho de nidificación, los autores observaron que las deposiciones periódicas de la hembra regulaban la humedad del nido, evidenciado por una humedad variable y por la presencia de ácido úrico sólido sobre el material de incubación (Manes *et al.*, 2003). En otro estudio, se observaron dos cuestiones muy importantes. Por un lado, la presencia de la hembra contribuye a la termorregulación de los nidos, impidiendo las bajas temperaturas y, por el otro, la ausencia de la hembra generaba un microclima con una humedad relativa muy baja, produciendo la muerte de embriones por deshidratación. Estas variaciones juegan un rol muy importante para asegurar el éxito de eclosión y la posterior supervivencia de las crías (Chani *et al.*, 1993).

El tamaño de la nidada varía de 20 a 54 huevos aproximadamente, y está correlacionado positivamente con el tamaño corporal de la hembra (Cruz *et al.*, 1999). Los huevos son blanquecinos, ovalados, de cáscara blanda y porosa. Tienen un peso promedio de 18 gr y miden aproximadamente 4,20 x 2,70 cm de longitud y ancho, respectivamente (Donadio y Gallardo, 1984; Yanosky y Mercolli, 1992). El período de incubación dura 60 ± 5 días a una temperatura de $29,5 \pm 0,5$ °C y humedad entre el 70 y 80%. La eclosión de los neonatos ocurre a mediados de enero o principios de febrero, pero puede prolongarse dependiendo de las condiciones climáticas durante el verano. Los animales no alcanzan la madurez reproductiva hasta pasado el cuarto invierno (Yanosky y Mercolli, 1992).

1.1.4.5. Comportamiento

Las poblaciones de *S. merianae* que habitan las regiones templadas y subtropicales, muestran un comportamiento marcadamente estacional con períodos equivalentes de actividad e hibernación (Noriega *et al.*, 2002). Los ciclos de actividades diarias y estacionales están fuertemente relacionados con la temperatura ambiental y las interacciones entre especies (Pianka y Vitt, 2003). Los individuos se encuentran activos a partir de que su temperatura corporal llega a los 25°C y no supera los 34°C aproximadamente (Winck *et al.*, 2011), especialmente al mediodía en época invernal y por la mañana en verano (Rocha, 2008). En días donde la temperatura del sustrato se eleva por encima de los 40°C, los individuos buscan microambientes como cuevas o cuerpos de agua donde refugiarse, tratando de regular la temperatura interna dentro del rango óptimo (Yanosky y Mercolli, 1991). A esa temperatura ambiental, las iguanas overas no podrían autoregularse y esto llevaría a la muerte de los individuos. En época invernal, los días más cortos y temperaturas más frías llevan a una menor actividad de los individuos por la reducción de su metabolismo (Andrade *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2004). De esta manera, los refugios son de gran importancia para los organismos ectotermos dado que la temperatura corporal y la tasa metabólica en reposo se determinan por el microclima de estos lugares. El comportamiento reproductivo de la especie se caracteriza por un patrón de emergencia protándrico, donde los machos son los primeros en emerger de las madrigueras y se vuelven competitivos y territoriales para atraer a las hembras (Winck y Cechin, 2008).

En general, son animales muy activos y se mueven elegantemente con movimientos lentos o rápidos dependiendo de la situación, mientras chasquean constantemente la lengua con una frecuencia de sondeo del sustrato (Winck *et al.*, 2011). *S. merianae* es un excelente nadador y si se siente amenazado estando en un cuerpo de agua puede permanecer sumergido durante al menos 22 minutos (Olmos, 1995), así como trepar a los árboles, aunque esto raramente sucede. Frente al hombre utiliza la huida como primer recurso, pero se puede defender violentamente al encontrarse acorralada, incluso produciendo autotomía caudal si se la atrapa desde la cola. De todos modos, se acostumbra rápidamente a la convivencia humana, y se puede comportar dócilmente tras una o dos semanas de contacto con el hombre, tornándose atrevida e incluso ingresando a la vivienda en busca de alimentos (Carreira *et al.*, 2005).

La autotomía caudal es una característica particular de los lagartos como mecanismo de supervivencia que permite la separación de la cola del cuerpo si el animal es atrapado por un depredador o queda restringido en un espacio pequeño o bien si es golpeado con algún objeto punzante (O'Rourke y Lertpiriyapong, 2015). Este fenómeno ocurre gracias a unos planos de fractura en las vértebras más distales de la cola, y la presencia de varillas cartilaginosas, en lugar de hueso que permiten la formación de una estructura de soporte para la nueva cola que en poco tiempo logra regenerarse (Barten y Fleming, 2014). Algunos autores consideran que la presencia de las amputaciones o marcas de regeneración indica la tasa de presión de depredación durante el ciclo de vida de los animales (Vitt, 1983). Por lo general, se observa una mayor tasa de regeneración en los adultos que en juveniles y neonatos, lo que refleja la supervivencia de individuos que llegaron a la adultez. Este tipo de comportamiento se observa tanto en la vida silvestre como en cautiverio.

1.2. HIPÓTESIS

- ♣ Hipótesis 1: El Ensayo de MN con enfoque citoma y el Ensayo Cometa presentan diferentes grados de sensibilidad para detectar el daño genotóxico en eritrocitos de *S. merianae*, generado por las tres formulaciones evaluadas.

- ♣ Hipótesis 2: Las formulaciones de GLIF (Roundup®), CIP (Atanor®) y ENDO (Galgofan®) inducen alteraciones en el material genético en ejemplares de *S. merianae* de corta edad (neonatos y juveniles) por diferentes vías de exposición.
- ♣ Hipótesis 3: Los plaguicidas estudiados interfieren en el crecimiento de los ejemplares de *S. merianae* de corta edad.
- ♣ Hipótesis 4: Los individuos de *S. merianae* que habitan en zonas expuestas ambientalmente a plaguicidas muestran valores de genotoxicidad diferentes que los animales que habitan en zonas no expuestas.

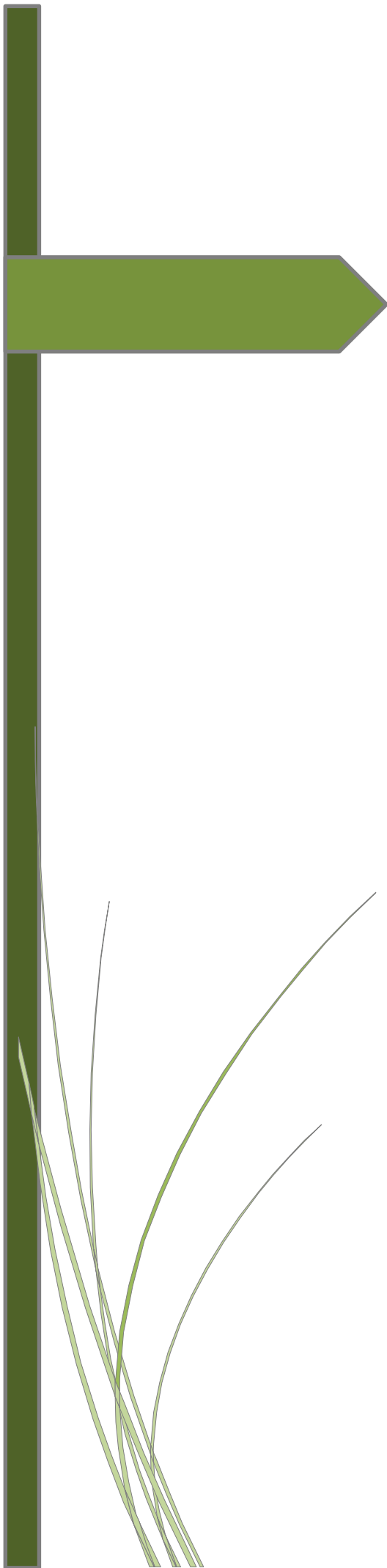
1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL:

Los ambientes naturales de la iguana overa se han modificado por el avance de la agricultura, con la presencia desmedida y permanente de plaguicidas de uso agrícola. Las formulaciones comerciales de plaguicidas utilizadas en agricultura se caracterizan por ser mezclas químicas complejas y su toxicidad debe ser evaluada como tal. Los reptiles tienen un metabolismo lento debido a su condición ectotérmica que da lugar a una dinámica diferente frente a episodios de toxicidad en relación a los vertebrados endotermos. La presencia de esta especie en ambientes perturbados y su fidelidad por estos lugares, asociado a los recursos que allí encuentra, nos permite utilizar a la especie como centinela de contaminación ambiental, posiblemente causada por la presencia de plaguicidas en su hábitat. El presente trabajo de Tesis doctoral propone determinar los efectos teratogénicos, genotóxicos y metabólicos en embriones y juveniles de *Salvator merianae*, expuestos a concentraciones sub-letales de tres formulaciones plaguicidas de amplio uso en la agricultura de nuestro país y, finalmente, realizar la evaluación de ejemplares adultos de poblaciones silvestres y neonatos nacidos de nidos expuestos ambientalmente a estos agentes químicos.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar la sensibilidad de *Salvator merianae* como modelo biológico en el monitoreo de genotoxicidad de tres agentes químicos de uso agrícola.
- Analizar la sensibilidad de los biomarcadores de genotoxicidad: Ensayo de Micronúcleo con enfoque citoma (MN-citoma) y Ensayo cometa (EC) en *S. merianae* como indicadores de genotoxicidad asociada a ciertos xenobióticos.
- Caracterizar el posible efecto embriotóxico y genotóxico de plaguicidas presentes en los ambientes naturales de *S. merianae* durante el desarrollo embrionario.
- Evaluar efectos genotóxicos y sobre el crecimiento de juveniles de *S. merianae* expuestos en forma semi-controlada a formulaciones plaguicidas en concentraciones utilizadas a campo, como una instancia previa a la evaluación de poblaciones silvestres ambientalmente expuestas.
- Evaluar el potencial efecto genotóxico por exposición *in situ* a plaguicidas en poblaciones silvestres de *S. merianae*.



CAPÍTULO II:

**Puesta a punto de
biomarcadores de
genotoxicidad y niveles
basales de daño en
*Salvator merianae***

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDAD

2.1.1.1. Ensayo Cometa

El Ensayo Cometa (EC) es una metodología que ha sido descrita hace más de 30 años por Ostling y Johanson (1984) como una forma sencilla de detectar roturas en el ADN en células individuales sembradas en microgel de agarosa. Sin bien los autores tenían conocimientos acerca de la existencia de un estudio realizado por Cook y sus colaboradores en 1970 donde describían la estructura del cometa, la publicación de Ostling y Johanson fue la primera en reportar la electroforesis de células lisadas embebidas en agarosa, aunque no usaron el término “Ensayo Cometa”. Esto fue presentado por Olive *et al.* (1990) unos años más tarde (Collins *et al.*, 2014). En esta metodología, los preparados se colocan en una solución de lisis con alto contenido de sales y detergentes, que en forma conjunta eliminan las membranas celulares, permitiendo la difusión de los componentes celulares. Las figuras obtenidas corresponden a ADN altamente condensado, que luego de completar el protocolo del EC, se identifican con el término “**nucleoides**” por su parecido con los núcleos celulares propiamente dichos. Debido a la carga negativa neta que posee el ADN, si en el material en estudio existen fragmentos, los mismos serán atraídos hacia el ánodo durante la electroforesis. La explicación acerca de la formación de los cometas se basa en un modelo descrito por Cook *et al.* (1976): el ADN se encuentra unido a una matriz nuclear más allá de los niveles de empaquetamiento y, aun cuando las histonas se eliminan durante el procedimiento del ensayo, el superenrollamiento característico del modelo de ADN, permanece. Al existir una ruptura de la cadena de ADN, ésta permite el relajamiento del bucle que es capaz de extenderse hacia el ánodo cuando recibe pequeñas descargas eléctricas durante la electroforesis. En síntesis, los bucles son los responsables de la formación de la cola del cometa (Collins, 2014; Fig. 2.1).

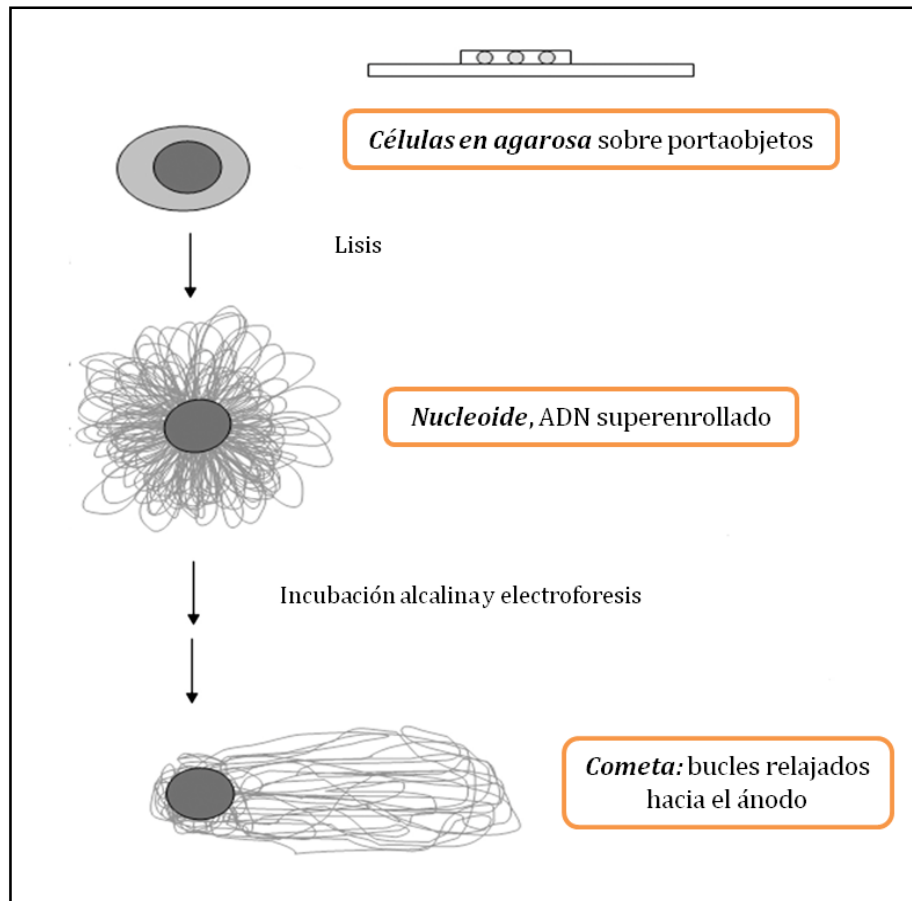


Figura 2.1. Principios generales de la formación del cometa en condiciones alcalinas. Modificado de Shaposhnikov *et al.* (2009).

Con el pasar de los años, el EC fue sufriendo modificaciones en el intento de aumentar su aplicabilidad en diferentes tipos de células y organismos, entre ellos, linfocitos aislados y otras células de mamíferos cultivadas, células epiteliales (bucales, nasales) de humanos, eritrocitos de sangre periférica de organismos no mamíferos, hemolinfa de moluscos, de lombrices de tierra, levaduras y núcleos aislados de tejido vegetal (Kleinsasser *et al.*, 2004; Rigonato *et al.*, 2005; Szeto *et al.*, 2005; Holland *et al.*, 2008; Azqueta *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Yıldız *et al.*, 2009; Ciacci *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2013; Martins y Costa, 2015).

Las diferentes versiones del EC tuvieron el propósito de ampliar la caracterización del espectro de lesiones que pudieran detectarse en el ADN dañado (Collins, 2014). La primera versión realizada a pH neutro tenía sus limitantes ya que sólo permitía detectar roturas de doble cadena (RDC; Olive *et al.*, 1990). En cambio, la versión alcalina (pH > 13) introducida por Singh *et al.* (1988) permitió

detectar como daños primarios al ADN ya no sólo RDC sino también roturas de cadena simple (RSC) y sitios álcali lábiles (SAL) (Fig. 2.2). Más recientemente, el EC se ha asociado a la técnica de FISH que aporta un nuevo posible uso para analizar la inducción del daño al ADN en secuencias o genes específicos (Spivak, 2015).

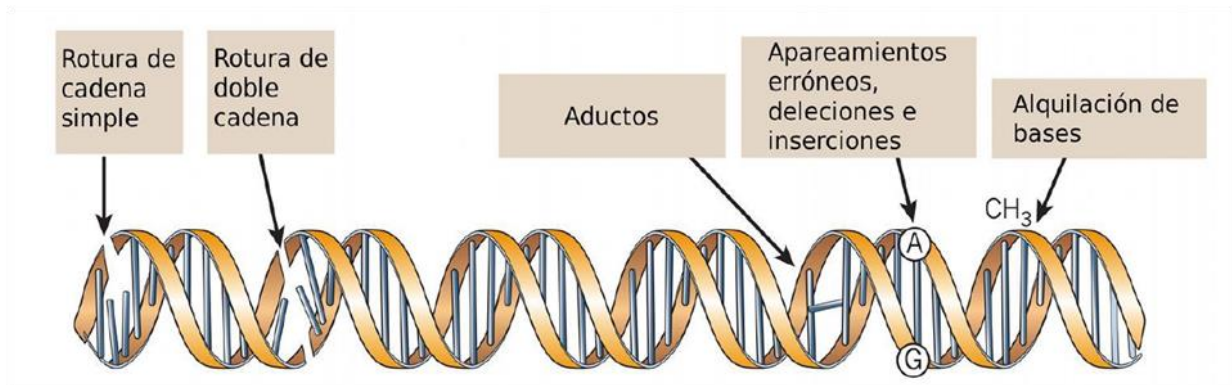


Figura 2.2. Tipos de daño en la doble cadena del ADN. Modificado de Lord y Ashworth (2012).

Existen dos tipos de análisis de los cometas, uno visual y el otro mediante el uso de software. En el caso del análisis visual, los cometas pueden ser clasificados en forma arbitraria en cinco categorías de daño (clase 0–4) de acuerdo a la migración del ADN, o mediante la estimación de la longitud de la cola medida en micrómetros (Hartmann *et al.*, 2003). En el caso del método alternativo, el análisis de imágenes con un *software* puede estimar ciertos parámetros como el porcentaje de ADN en la cola y en la cabeza, la longitud de la cola (en inglés *Tail length*), el momento de la cola (en inglés *Tail moment*) o momento de la cola de Olive (en inglés *Olive tail moment*) (Tice *et al.*, 2000; Azqueta *et al.*, 2011). El “momento de la cola” fue introducido por Olive *et al.* (1990) y se define como el producto de la longitud de la cola medida por el *software* y la fracción (unidades arbitrarias) de ADN en la cola (Andem *et al.*, 2013). Este método incorpora medidas tanto del tamaño más pequeño de ADN migrante que se puede detectar (reflejado por la longitud de la cola del cometa) como la cantidad de ADN con rupturas que han migrado desde la cabeza (representadas por la intensidad de tinción del ADN en la cola) (Liao *et al.*, 2009). Las dos opciones son válidas y brindan resultados confiables, por lo que el método elegido dependerá de los recursos disponibles y el objetivo de la investigación

(Azqueta *et al.*, 2011). Hay numerosas recomendaciones para aplicar este biomarcador en condiciones adecuadas y estandarizadas, entre ellas una de las más importantes, es la que sugiere que los portaobjetos sean codificados y analizados a ciegas para que el operador no tenga conocimiento de las condiciones de tratamiento, tanto individual como grupal, al que pertenecen cada una de los extendidos del material en estudio (OECD 475, 2014a; OECD 489, 2014b).

El EC se distingue de otros ensayos de monitoreo de daño al ADN por su demostrada sensibilidad, rapidez y simplicidad para detectar bajos niveles de daño en células individuales de una muestra pequeña, con bajo costo y aplicabilidad en cualquier población de células nucleadas (Tice *et al.*, 2000; Collins, 2004). Se utiliza en protocolos industriales para el análisis y caracterización *in vitro* de sustancias potencialmente genotóxicas y se ha sugerido su uso *in vivo* como ensayo de seguimiento de resultados positivos de genotoxicidad *in vitro* para evaluar mecanismos de acción y/o células blanco-específicas (Hartmann *et al.*, 2003; 2004; Burlinson *et al.*, 2007; Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015). En los últimos años, el EC tomó gran protagonismo como parte de la batería de estudios propuesta en monitoreo ambiental por haberse aplicado con éxito en distintos organismos de diferentes ecosistemas, permitiendo la detección de efectos genotóxicos de una amplia variedad de agentes químicos presentes en los ambientes naturales. Por este motivo, es recomendado para estudios ecotoxicológicos aplicados en células de organismos silvestres considerados “centinelas”, ya que ponen en evidencia la exposición a corto y largo plazo de los mismos en su hábitat natural (Ali *et al.*, 2009; De Castilhos Ghisi y Cestari, 2013; Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015; de Lapuente *et al.*, 2015; Quero *et al.*, 2016; Perussolo *et al.*, 2019).

2.1.1.2. Ensayo de Micronúcleo (MN)

Los MN fueron descritos por primera vez en células sanguíneas de ratas y gatos por William Howell en 1890 y Justin Jolly en 1905. También fueron observados en reticulocitos humanos de pacientes con anemia grave (Hayashi, 2016). Los hematólogos detallaron la presencia de pequeños “cuerpos” que si bien se teñían como el núcleo celular, se localizaban en el citoplasma de los eritrocitos. Hoy son conocidos como cuerpos de Howell-Jolly en honor a ambos hematólogos (Guo

et al., 2019). En la década de 1950, distintos investigadores observaron la presencia de los MNs mientras estudiaban el efecto *in vitro* de las radiaciones ionizantes sobre la especie vegetal *Vicia faba* y trataron de cuantificarlos. John Evans y colaboradores (1959) fueron los primeros en utilizar los MNs como medida de daño por exposición a radiación. En la década del 70, se desarrolló un método de prueba para evaluar la frecuencia de células micronucleadas que fue aplicado por Von Ledebur y Schmid (1973) en estudios *in vivo* a partir de médula ósea de ratón tratados con un agente alquilante fuerte. Posteriormente, el grupo de trabajo de Schmid (1975) y Heddle (1973) establecieron los conceptos básicos del ensayo de MN (Hayashi, 2016). En 1985, Fenech y Morley propusieron realizar el ensayo de MN *in vitro* con bloqueo de la citocinesis (MNBC) modificación que permitió y facilitó el análisis de MN en linfocitos de sangre periférica humana luego de completarse la primera división celular (Fenech y Morley, 1985). Este método requiere del uso de la citocalasina-B (Cyt-B), un inhibidor del ensamblaje de los microtúbulos del huso mitótico que impide la separación de los núcleos hijos, dando como resultado células binucleadas (Fenech, 2000). En los últimos años, se incorporó al listado de posibilidades de aplicación del ensayo de MNs, su análisis en células epiteliales de la mucosa bucal para estudios en poblaciones humanas expuestas tanto ambiental y laboralmente como por estilos de vida (Thomas *et al.*, 2009). Actualmente, estos métodos son ampliamente utilizados por el Proyecto Internacional Human Micronucleus Project para monitorear el nivel basal de MN en distintas poblaciones humanas (Fenech *et al.*, 2011; Brusick *et al.*, 2016). Desde la inclusión del ensayo de MN en la OECD, tanto la versión *in vitro* (con el uso de citocalasina) como el método *in vivo* para células de mamíferos, para generar las condiciones estandarizadas y permitir que los estudios realizados en diferentes laboratorios sean comparables se deben seguir las recomendaciones de las directrices N° 487 y 474, respectivamente (OECD, 2010, 2014a).

La comprensión sobre el origen y formación de los MNs ha sido de interés relativamente constante durante décadas y se ha aceptado en forma generalizada, que los MNs se originarían a partir de fragmentos de cromosomas o de cromátidas acéntricas (sin centrómero) o de cromosomas enteros que no lograron ser incluidos en los núcleos hijos en el final de la mitosis, debido a una incorrecta

adherencia a los microtúbulos del huso mitótico en el proceso de segregación de la anafase, impidiendo su correcta migración a los polos (Fenech *et al.*, 2011; Lynch *et al.*, 2019). El material genético rezagado finalmente es rodeado por una membrana nuclear durante la telofase, adoptando la morfología de un pequeño núcleo en interfase, conocido como “micronúcleo” (Fenech, 1998). Estos MNs son claramente reconocibles al microscopio óptico (Mudry y Abrevaya, 2006), se identifican como pequeñas estructuras esféricas similares a núcleos satélites rodeando al núcleo principal o primario sin ningún vínculo físico que permita relacionarlo con este último. Es decir que deben visualizarse muy claramente los bordes de cada uno de ellos (Guo *et al.*, 2019). De acuerdo con las descripciones establecidas por Schmid (1975) para células sanguíneas de mamíferos, los MNs tienen un tamaño de 1-5 μm de diámetro, 1/16 a 1/3 del diámetro del núcleo primario, deben tener el mismo color e intensidad de tinción que el núcleo principal y no deben refractar a la luz del microscopio. El tamaño del MN debe ser menor a un tercio del tamaño del núcleo principal y tanto el MN como el núcleo principal deben estar en el mismo plano focal. Por cada muestra o individuo, se realizan preparados por duplicado y se debe contabilizar un total de 1000 células. En el caso del ensayo de MN *in vivo* se calcula la frecuencia de MN como la cantidad de células micronucleadas en un total de 1000 células contabilizadas. Mientras que en el ensayo *in vitro*, se calcula la frecuencia de formación de MN por la fórmula: $MN = A/B$, donde (A) es la cantidad de células con MN observadas y (B) es la cantidad de células binucleadas contabilizados por preparado (como mínimo 1000 o 2000) (Kirsch-Volders *et al.*, 2003; Araldi *et al.*, 2015).

El daño al material genético puede ocurrir en cualquier etapa del ciclo celular, sin embargo la expresión del daño cromosómico se observa luego de completar la división nuclear, dependiendo de la cinética del ciclo celular y del mecanismo de inducción del daño a analizar (Bolognesi y Hayashi, 2011). Es así que los MNs se forman en el proceso de la transición de metafase a anafase. Los agentes con una potencial capacidad genotóxica pueden inducir daño bajo la forma de roturas de ADN de doble cadena (RDC) que, al no ser reparadas, derivan en la formación de fragmentos acéntricos y reordenamientos de cromosomas a partir de los extremos rotos, por lo cual se los considera agentes clastogénicos. Mientras que los agentes aneugénicos son aquellos que inducirían el daño a nivel de

distintos blancos de ataque estructurales durante el proceso de división celular, causando la pérdida de cromosomas enteros (Doherty, 2012; Terradas *et al.*, 2016) (Fig. 2.3).

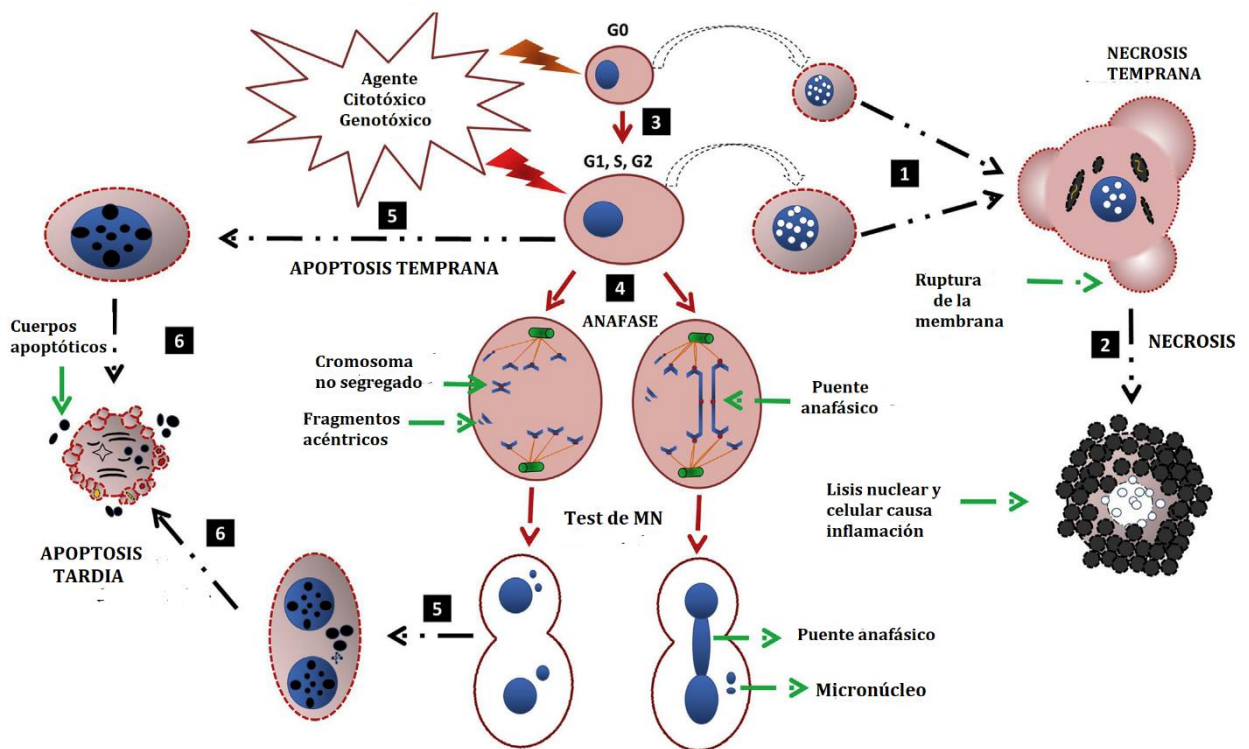


Figura 2.3. El esquema muestra las distintas vías que pueden dar origen a los MNs a partir de la acción de agentes clastogénicos y aneugénicos. Tomado de Araldi *et al.* (2015).

Los genotóxicos pueden ser tanto de carácter exógeno como endógeno. A partir de estudios realizados *in vitro* hace muchos años, se obtuvieron fuertes evidencias sobre la potencial capacidad de ciertas sustancias endógenas para interactuar con el ADN e inducir daño genético durante procesos fisiológicos normales (Burcham, 1999; Eaton y Gilbert, 2008; Heuser *et al.*, 2008). Algunas fuentes endógenas incluyen subproductos metabólicos (principalmente especies reactivas de oxígeno, EROs), detención prolongada en la progresión de la horquilla de replicación del ADN y acortamiento de los telómeros (Vitale y Kroemer, 2017; Guo *et al.*, 2019) que pueden dar lugar a puentes de cromatina o fragmentos acéntricos. Por otra parte, los defectos durante el ensamblaje del huso mitótico, la regulación errónea del punto de control del ensamblaje del huso, la presencia de centrosomas supernumerarios, la inhibición de la citocinesis o el daño del cinetocoro, entre otros, pueden generar efectos aneugénicos (Terradas *et al.*, 2016; Russo y Degrassi, 2018). La bibliografía

manifiesta que estos eventos contribuyen a la formación “espontánea” de MNs. Asimismo, hay bibliografía que sostiene que los altos niveles de daño al ADN generado en forma endógena promoverían la oncogénesis y podrían incluso colaborar en el mantenimiento de la progresión maligna (Vitale y Kroemer, 2017). Por esta razón, es importante conocer los valores de referencia característicos para la especie que se utilizará como bioindicador, siendo la más apropiada en estudios de genotoxicidad aquella especie que presente valores basales bajos y estables (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

En los últimos años, el avance tecnológico permitió el desarrollo de sondas específicas capaces de localizar el material genético rezagado y recluido en los MNs. Así, el ensayo de MN *in vitro* en combinación con la técnica de FISH (en inglés fluorescence in situ hybridization) o con la tinción de cinetocoro (CREST) abrieron un camino hacia las posibles interpretaciones mecánicas sobre el origen de los MNs, permitiendo diferenciar entre la actividad clastogénica y la aneugénica ante la exposición a un agente determinado (Migliore *et al.*, 2014; Terradas *et al.*, 2016; Wilde *et al.*, 2018). Estas nuevas aplicaciones de metodologías combinadas en numerosas investigaciones realizadas *in vitro* en células humanas contribuyeron a la comprensión de los eventos celulares que pueden dar origen a los MNs y sus posibles consecuencias biológicas. Las vías subyacentes en estos eventos son complejas y heterogéneas, y para su mejor comprensión pueden analizarse según 4 grupos: orígenes mitóticos, premitóticos, postmitóticos e interfásicos. En el primer grupo, la formación de MNs puede darse a partir de diferentes eventos asociados a la disfunción del aparato mitótico que conlleva a cromosomas rezagados, entre ellos: (1) una deficiencia o una activación excesiva en el punto de control del ensamblaje del huso, (2) cromosomas con uniones merotéticas (cuando un solo cinetocoro se adhiere a los microtúbulos de los polos opuestos del huso) que no fueron corregidas, (3) alteración del ensamblaje cinetocoro-centrómero, (4) la no eliminación o eliminación defectuosa de la cohesina que mantiene unidas a las cromátidas hermanas. El segundo grupo involucra fragmentos cromosómicos acéntricos que surgieron por rupturas bicatenarias y fragmentos extracromosómicos a partir de ADN amplificado, que al ser rezagados dan origen a MNs. En el tercer grupo, (1) la ruptura múltiple de puentes nucleoplásmicos desde cromosomas dicéntricos, (2)

defectos en el reensamblaje de la envoltura nuclear y (3) la fusión celular después de una mitosis multipolar y citocinesis incompleta, pueden contribuir a la micronucleación. Por último, en el cuarto grupo se incluye a distintos orígenes de formación MNs que ocurren durante la interfase del ciclo celular tales como la reducción de la lámina nuclear B1, la formación de brotes nucleares, la ruptura de la envoltura nuclear y los cuerpos o inclusiones provenientes del nucléolo denominados “agresomas nucleolares” (Guo *et al.*, 2019). Varios estudios proporcionan evidencias de que el aislamiento físico de los cromosomas dentro de MN actúa como plataforma clave para un evento catastrófico denominado cromotripsis (Fenech *et al.*, 2016; Marozzi *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2019), una fragmentación masiva del ADN local que genera reordenamientos complejos restringidos a uno o varios cromosomas seguido de un reensamblaje al azar. Los defectos en la membrana nuclear de los MN (por ausencia de la lámina B1) afectan las funciones nucleares básicas como la reparación y replicación del ADN, lo que conlleva a un daño masivo en la cromatina micronuclear (Terradas *et al.*, 2018). Cuando ésta se reincorpora en las células hijas en divisiones celulares posteriores (Zhang *et al.*, 2015), la cromatina sub-replicada, dañada o reorganizada podría contribuir a la inestabilidad del genoma (Terradas *et al.*, 2016). Se cree que los MN introducen cierto estrés celular en las células que lo contienen, observándose estrés de replicación en los MN y en consecuencia defectos de replicación en el núcleo principal durante la siguiente fase S. La presencia de estos fenómenos en células germinales impacta en la reproducción, generando problemas de fertilidad, abortos involuntarios y nacimientos de individuos con un alto riesgo de enfermedades en la edad adulta. Además, los MN pueden desencadenar una respuesta inmune innata considerada como la responsable de la mayoría de las consecuencias biológicas como la inflamación, la senescencia, la muerte celular y el cáncer (Guo *et al.*, 2019).

Debido a su simplicidad, el ensayo de MN es uno de los ensayos más aplicados para identificar alteraciones genómicas en animales de vida silvestre. Se lo considera técnicamente más fácil y rápido de implementar que otros ensayos citogenéticos, como Aberraciones Cromosómicas, y fundamental a tener en cuenta, por el hecho de poder aplicarse en cualquier población celular en proliferación, sin necesidad de sacrificar al individuo en estudio. Bolognesi y Hayashi (2011) indican que éstas son

algunas de las razones de su amplia utilización en humanos en evaluaciones de monitoreo ambiental de poblaciones expuestas a determinados contaminantes, así como en evaluaciones de riesgo ocupacional y por exposición a carcinógenos (Gonsebatt, 2006). En animales silvestres, su aplicación se realiza preferentemente en células sanguíneas, ya que se consideran representativas de los daños generados en otras células del organismo (Frenzilli *et al.*, 2009; Barata *et al.*, 2010). La función de la sangre vista como un vehículo de transporte y distribución de contaminantes después de la absorción, convierte a este tejido en adecuado para la detección de contaminantes en los vertebrados (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). Así, es el tejido más informativo en cuanto al estado de salud de los animales, aunque no siempre sea el más fácil de obtener durante los muestreos a campo (Douglas *et al.*, 2010). En este panorama, las células predilectas para estudios ecotoxicológicos y de genotoxicidad en reptiles, así como en otros vertebrados no mamíferos, son los eritrocitos (Fig. 2.4) (Davis y Floyd, 2014; Furnus *et al.*, 2014; Latorre *et al.*, 2014).

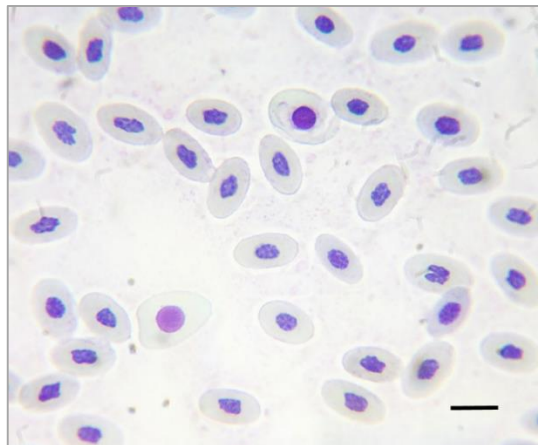


Figura 2.4. Eritrocitos de sangre periférica de *S. merianae*. Tinción con Giemsa, magnificación 1000X. Barra= 25 μ m.

Estas células tienen una vida promedio aproximada de 600 días en vertebrados no mamíferos (Martínez-Silvestre *et al.*, 2011; Maceda-Veiga *et al.*, 2015), mantienen su núcleo durante todo su ciclo celular y experimentan división celular durante la circulación en el torrente sanguíneo. De esta manera, las figuras mitóticas en estos eritrocitos en circulación son normales, si bien en reptiles suelen observarse con menor frecuencia (Sykes y Klaphake, 2015).

2.1.2. DAÑO BASAL AL ADN Y FACTORES DE VARIABILIDAD EN REPTILES

El estudio de la integridad del material genético fue cobrando mayor importancia en las últimas décadas debido al reconocimiento del creciente deterioro ambiental asociado a las actividades antrópicas. Así se avanzó notablemente en la caracterización de diversas sustancias como contaminantes ambientales, hoy consideradas como una de las principales causas del daño no deseado observable a distintos niveles. Luego de años de investigación, hoy se conoce que tanto los procesos endógenos como los agentes exógenos pueden actuar como inductores de daño al material genético. Los primeros son responsables de varios cientos de daños al ADN por célula por día (Lindahl y Barnes, 2000). Entre estos, se encuentran el proceso de replicación del ADN, uno de los más propensos a producir errores como la adición incorrecta de una base o el aumento de "gaps" o fracturas en los sitios frágiles (Escribano *et al.*, 2009). Además, las especies reactivas del oxígeno (EROs) se generan como resultado del metabolismo oxidativo de las células y pueden incrementarse por agentes del medio ambiente. El término EROs involucra tanto a radicales libres como oxidantes no radicales. Los radicales libres son átomos o compuestos que contienen uno o más electrones no apareados en sus órbitas externas. Entre los más potentes y de importancia biológica se encuentran el superóxido ($\bullet\text{O}_2$), el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), y el óxido nítrico (Finkel y Holbrook, 2000). Estos radicales son altamente reactivos e inestables y existen solo por micro o nanosegundos hasta desencadenar reacciones en cadena que generan compuestos aún más dañinos. Los oxidantes no radicales son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso y el oxígeno singlete, pueden persistir por más tiempo hasta causar daño oxidativo a las biomoléculas (Surai, 2002). Alrededor del 10% de las EROs se produce en forma controlada en los compartimentos celulares y cumplen funciones celulares, por ejemplo, en la señalización celular y la regulación de la relajación del músculo liso y en la defensa inmune (Dröge, 2002). Sin embargo, si los niveles de moléculas oxidantes aumentan y exceden a la capacidad del sistema enzimático antioxidante, la célula se encuentra sometida a lo que se ha denominado estrés oxidativo (Monaghan *et al.*, 2009). Se ha descrito que, estas moléculas oxidantes (superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno) al reaccionar con el ADN causan alteraciones en las

bases (por ejemplo, 8 oxo-guanina y glicol de timina), sitios abásicos denominados sitios AP (apurínicos o apirimidínicos), y desaminación de citosinas y 5-metilcitosinas que generan uracilos y timinas, respectivamente (Cemeli *et al.*, 2009). Si bien los daños son reparados continuamente por una variedad de procesos de reparación del ADN presente en todas las células (Baršiene *et al.*, 2012), es fundamental conocer las frecuencias de producción endógena del daño de las células en condiciones normales, debido a que las mismas pueden verse aumentadas por la acción genotóxica de ciertos agentes exógenos (Preston y Hoffmann, 2008). El daño, ya sea basal o inducido, puede convertirse en abrumador para la maquinaria celular, generando mutagénesis, proceso que a su vez puede llevar a otro más complejo e irreversible como es el de carcinogénesis, por ejemplo cuando las lesiones genéticas tienden a acumularse y pueden conducir a una amplia variedad de resultados adversos, entre los que se incluyen apoptosis o muerte celular, así como alteración en la división celular, proliferación, o replicación del ADN (Beedanagari *et al.*, 2014). En este contexto, la medición del nivel basal del daño genético mediante biomarcadores de genotoxicidad es fundamental para caracterizar a la especie en sí misma, y de acuerdo al tipo celular de interés (Zúñiga-González *et al.*, 2001; Pant *et al.*, 2014). Ciertas características celulares o individuales pueden ejercer influencia en la generación del daño basal, por lo cual se debe prestar atención especialmente cuando se trabaja en estudios *in vivo*. En la literatura consultada se suelen denominar como “*variables de confusión*” o bien se los considera como “*factores de variabilidad*” debido a que pueden llegar a enmascarar los resultados reales, sin estar asociados con la variable en investigación. Tales factores deben ser controlados con el fin de obtener una estimación no distorsionada del efecto de la/s variable/s en estudio (Duffus, 2006; Gendron, 2013). Algunos de estos factores de particular importancia en estudios con animales silvestres son, entre otros: la edad, el sexo, el estado de salud, la carga parasitaria, la estacionalidad o la migración de los individuos de un ecosistema a otro (Cossu-Leguille y Vasseur, 2013).

La edad como factor de variabilidad, en relación al aumento del daño en el material genético asociado al envejecimiento celular, ha sido mayoritariamente objeto de estudio en animales de laboratorio y en poblaciones humanas. (Bolognesi *et al.*, 1997; Dass *et al.*, 1997; Zúñiga-González

et al., 2001; Cristaldi *et al.*, 2004; Heuser *et al.*, 2008). Se ha considerado que el envejecimiento es un proceso natural en el que las funciones de los tejidos y órganos del cuerpo disminuyen con el avance de la edad, por el deterioro en la organización de la cromatina (Morley, 1995).

En el caso particular de nuestro trabajo, en más de los factores antes mencionados, la evaluación de una variable denominada “*efecto nido de origen*” (en inglés *clutch effect*) fue incorporada en el desarrollo de la presente Tesis doctoral, teniendo en cuenta que todo posible factor de variación debería poder ser controlado en todo diseño experimental a fin de lograr una adecuada interpretación de los hallazgos sin introducir sesgos en el análisis de las respuestas de los biomarcadores (Cossu-Leguille y Vasseur, 2013). Si bien este factor es contemplado muy frecuentemente en estudios de cocodrilianos, no está determinada su influencia en otras especies reptilianas como es el caso que nos ocupa con *S. merianae*. En función de esta vacancia de conocimiento, dicha variable fue incluida en los distintos diseños experimentales realizados en el marco de este trabajo de Tesis. El *efecto nido de origen* representa la influencia genética de los parentales en combinación con las condiciones ambientales de incubación, donde la humedad y la temperatura son factores determinantes para las características de la nidada y, en consecuencia, la posterior supervivencia de los neonatos (Verdade, 1997; Páez *et al.*, 2009). En este contexto, los animales provenientes de distintos nidos pueden diferir en la respuesta que expresan frente a diferentes condiciones ambientales durante todo su ciclo de vida (Poletta *et al.*, 2008). Esa variabilidad genética en respuesta a las influencias ambientales determina la susceptibilidad (conocida en los seres humanos como la predisposición genética) del individuo o de la población a una sustancia tóxica, lesión o enfermedad (Beedanagari *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha de tener presente que la validación de los ensayos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* requiere de la determinación de su sensibilidad, especificidad (capacidad para identificar y reconocer a los agentes perjudiciales), y el valor predictivo para el punto final (en inglés *endpoint*) en evaluación (Faustman y Omenn, 2008). Es fundamental una selección adecuada de los biomarcadores que conformarían la batería para la evaluación genotóxica que se desea realizar y para lo cual es necesario un análisis detallado de los factores que pueden incidir en este proceso de

valoración. Por otra parte, el uso de un modelo biológico sin precedentes en estudios de genotoxicidad implica un mayor trabajo al inicio ya que se requiere de la puesta a punto del protocolo a desarrollar de acuerdo al tipo celular y a la variación intra e interindividual de la especie elegida, en una población no expuesta que es la que permitirá caracterizar a la especie en su estado natural y que por tanto será considerada como población control.

2.1.3. ANTECEDENTES DE GENOTOXICIDAD EN REPTILES

En reptiles, los estudios ecotoxicológicos vinculados a agentes genotóxicos se han focalizado en especies acuáticas de quelonios y cocodrilianos (Rauschenberger *et al.*, 2004a; Wu *et al.*, 2006; Beldomenico *et al.*, 2007; Poletta *et al.*, 2008; Caliani *et al.*, 2014; Latorre *et al.*, 2014; González Aguilera *et al.*, 2015). Sin embargo, los agentes químicos con acción genotóxica también pueden desplazarse a través del ecosistema terrestre, por lo que es importante la inclusión de las especies terrestres en los estudios ecotoxicológicos, siendo que éstas pueden ocupar una mayor diversidad de hábitats y estar expuestas a una mayor variedad de contaminantes ambientales, entre ellos los plaguicidas que son de interés en este trabajo de Tesis. Por su parte, los Squamata, son en su mayoría especies terrestres representadas por lagartos, iguanas, serpientes y camaleones, y en comparación con otros vertebrados, han sido objeto de muy pocos estudios en el área de la genotoxicidad (Zúñiga González *et al.*, 2001; Strunjak-Perovic *et al.*, 2010; Capriglione *et al.*, 2011; Mohamad y Kadry, 2014). Esta escasa representación de especies reptilianas en las evaluaciones ambientales se debe a la ausencia de modelos reptilianos de laboratorio para estudios ecotoxicológicos y de evaluaciones de riesgo (Hopkins, 2000; Mitchelmore *et al.*, 2005).

De acuerdo a estos antecedentes, se puede asumir que las poblaciones naturales no estarían siendo protegidas adecuadamente (Hall y Henry, 1992; Amaral *et al.*, 2012b). En el caso particular de *S. merianae*, la aplicación de metodologías para análisis de genotoxicidad se desconocía al inicio de este trabajo de Tesis doctoral, con lo cual fue prioritaria la estandarización de los dos biomarcadores de nuestro interés, ensayo de MN y EC en eritrocitos de sangre periférica de iguana. La propuesta de este Capítulo continúa con la caracterización del daño genético basal y la influencia de la edad y el

nido de origen como factores de variación en iguanas de ambientes no perturbados, para su utilización como datos de referencia a los fines comparativos en posteriores estudios en ambientes que han sufrido exposición a contaminantes ambientales y así poder evaluar posibles efectos no deseados que estarían pasando totalmente desapercibidos.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES UTILIZADOS

2.2.1.1. En la puesta a punto de los biomarcadores a estudiar

Se utilizaron 6 animales adultos (4-6 años de edad estimado de acuerdo a la LHC, ver apartado 1.1.4.4), 3 machos y 3 hembras criados en cautiverio y pertenecientes al plantel de la Estación Zoológica Experimental "Granja La Esmeralda" de la ciudad de Santa Fe, Provincia de Santa Fe, Argentina (31° 58' 5.82" S, 60° 69' 44.69" W).

2.2.1.2. En la determinación de los valores basales de daño al ADN

En esta etapa se utilizaron animales de distintas edades provenientes de diferentes sitios. En el caso de los adultos, se utilizaron 10 machos y 10 hembras de distintas edades que pertenecían al mismo plantel mencionado en el punto anterior. En el caso de los juveniles y neonatos, se utilizaron 21 individuos de 1 año de edad provenientes de 3 nidos y 24 individuos de 1 día de vida provenientes de 3 nidos diferentes. En esta última tanda, los animales de menor edad nacieron de huevos recolectados como parte del programa de rancheo del Proyecto Iguanas (PI), en la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (30°11'26"S, 61°0'27"O), un área natural protegida (Ley 12.930, 2008) localizada en el Departamento San Cristóbal de la Provincia de Santa Fe, Argentina. Por su condición de área protegida, en ella no se permite la realización de actividades agrícolas o de cualquier otra índole que pudieran causar contaminación en el ambiente. Esto brindó la seguridad de que los huevos no habían estado expuestos previamente a ningún xenobiótico en forma directa (Fig. 2.5).

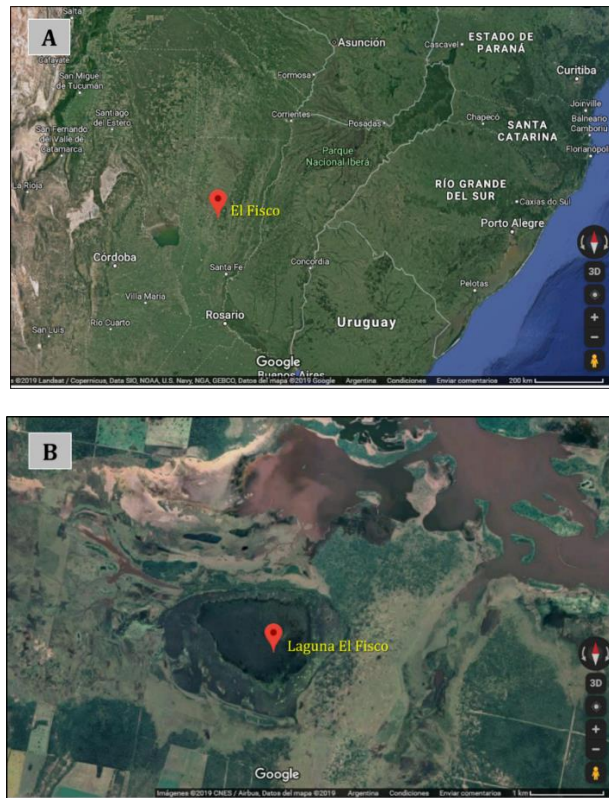


Figura 2.5. Imagen satelital de la provincia de Santa Fe donde se visualiza (A) la ubicación de la Reserva Natural Manejada “El Fisco” en el centro-norte de la provincia (icono rojo), y (B) el área de extensión de la reserva donde se colectaron los huevos de iguana overa. Tomada de Google Earth.

Todos los huevos utilizados fueron incubados artificialmente en las incubadoras del PI, en condiciones controladas de humedad no mayor al 80% (Yanosky y Mercolli, 1995b), y en un rango de temperatura de 29 a 31,5 °C. La incubación tuvo una duración aproximada de 60 ± 5 días, con una marcada asincronía de nacimientos entre los neonatos del mismo nido, tal como fue reportado por Yanosky y Mercolli (1995) y observado en el PI.

En el caso de los juveniles, posterior a la eclosión, los mismos fueron criados en condiciones controladas de cautiverio en las instalaciones del Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC/MMA) en la ciudad de Santa Fe, hasta cumplirse el año de edad para realizar la toma de la muestra de sangre y poder llevar a cabo la determinación de los valores basales de genotoxicidad. Para esto, se acondicionó una sala conforme a los requerimientos de la especie: climatización acorde a las estaciones del año que contaba con piedras calefactoras a disposición de las necesidades de los animales. Durante el lapso de un año, los animales fueron alimentados *ad*

libitum cuatro veces por semana, en alternancia con los días de limpieza. La comida consistió en una mezcla de 50% de cabeza de pollo triturado y 50% de alimento balanceado para reptiles, frutas (bananas, manzanas y peras), verduras (zapallitos, zanahorias) y huevos de gallina, enriquecida con un suplemento vitamínico marca TetraFauna ReptoCal (ver Anexo 2.1), recomendado para especies reptilianas. Además, fueron colocados diariamente bajo luz natural del sol y en los días nublados y lluviosos, bajo iluminación artificial (lámparas de luz UV marca Sylvania Reptistar®) para favorecer la síntesis de la vitamina D₃ necesaria para la absorción del calcio.

En el caso de los neonatos, los individuos fueron mantenidos en condiciones óptimas de crianza durante 24 horas post-eclosión hasta la obtención de la muestra de sangre para llevar a cabo la determinación de los valores basales de genotoxicidad mediante los biomarcadores planteados.

2.2.2. DETERMINACIÓN DE EDAD, SEXO Y PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE LOS ANIMALES

Dado que no es posible determinar la edad exacta de los individuos cuando no se conoce la fecha de eclosión, se acepta que una manera de estimarla es mediante la longitud hocico-cloaca (LHC) de los animales. Yanosky y Mercolli (1992, 1995a) como pioneros en el estudio de la biología de la iguana overa, señalaron que los individuos hasta los 70 días pueden considerarse "neonatos" o simplemente "crías", cuando poseen entre 11 y 25 cm de LHC se consideran "juveniles"; los que se encuentran entre 25 y 29 cm de LHC son "subadultos o preadultos", mientras que los "adultos" son aquellos que superan los 29 cm de LHC, y ya muestran un comportamiento reproductivo.

El sexo en los animales adultos fue determinado mediante el reconocimiento manual de un grupo de escamas que forman un pequeño montículo ("botón") en la superficie ventral del cuerpo, a los laterales de la cloaca de los machos adultos. Además, presentan otra característica peculiar que permite diferenciar a los machos de las hembras y es la presencia de músculos hipertrofiados en la mandíbula que les da la apariencia de un cuello más ancho (Hall, 1978; Yanosky y Mercolli, 1992). En el caso de los juveniles y neonatos, la determinación del sexo no pudo realizarse debido a la falta de experiencia para detectar el reconocimiento manual del "botón" que aún no es palpable en animales

tan pequeños, ya que sólo alcanzan aproximadamente 13 cm de longitud total, sumado a la ausencia de otros caracteres sexuales secundarios (descritos anteriormente) que permitieran la distinción entre sexos.

Para la medición de la LHC se utilizó una cinta métrica de metal con precisión de 0,5 cm para los adultos y de 0,1 cm para los juveniles y neonatos. Para pesar a los adultos y juveniles se utilizó una balanza eléctrica marca Dixie Kretz con capacidad de hasta 5000 g (precisión de 1 g), mientras en el caso de los neonatos se usó una balanza marca OHAUS CS200 con capacidad hasta 200 g (precisión de 0,1 g).

2.2.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA

De acuerdo con los objetivos planteados para desarrollar en este Capítulo, se realizaron extracciones de sangre en distintas oportunidades. En primer lugar, se obtuvieron muestras de sangre de los animales adultos para la puesta a punto del Ensayo Cometa (EC) y del Ensayo de micronúcleo (MN). En segundo lugar, se obtuvieron las muestras sanguíneas de los ejemplares adultos, juveniles y neonatos para la determinación de los valores basales de daño genético mediante los biomarcadores que fueron adaptados para trabajar con esta especie reptiliana.

En todos los grupos etarios, se extrajo sangre periférica de la vena caudal de cada animal de acuerdo a la técnica descrita por Olson *et al.* (1977). La vena se encuentra justo debajo de las vértebras, por lo que se puede acceder lateral o ventralmente. En ambos casos se debe trabajar en condiciones de asepsia, insertando la aguja entre las escamas en un ángulo de 90° respecto de la vena, y dirigida medialmente, teniendo en cuenta, en los machos, una distancia apropiada a la cloaca para evitar los hemipenes (Jenkins-Perez, 2012; Fig. 2.6). Este sitio se identifica por la ranura longitudinal donde se encuentra la musculatura ventral y dorsal (Sykes y Klaphake, 2008).



Figura 2.6. Extracción de sangre a un adulto de *S. merianae*. Barra= 4 cm. Foto: L.G. Schaumburg.

Se utilizaron jeringas descartables heparinizadas y agujas de diferentes calibres dependiendo del tamaño corporal de los individuos muestreados. En adultos y juveniles se usaron jeringas de 3 ml y agujas tamaño 21 G x 1” para extraer 1 ml de sangre en adultos y 0,50 ml en juveniles. En neonatos se usaron jeringas de 1 ml con una aguja de 25 G x 5/8” para extraer 50 µl de sangre.

2.2.4. ENSAYO COMETA

El primer paso para aplicar el protocolo de Ensayo Cometa (EC) corresponde a la determinación de la viabilidad celular de las muestras de sangre periférica extraída de los animales. Para que el EC tenga validez se considera que la cantidad de células vivas por muestra debe superar al 90% del total. Esta caracterización se realizó mediante el ensayo de fluorocromos ADN-específicos (Mercille y Massie, 1994). La técnica requiere de una solución de trabajo de 100 µg/ml Naranja Acridina (NA) y 100 µg/ml Bromuro de Etidio (BE), en PBS libre de CA^{2+} y Mg^{2+} (ver Anexo 2.1). Las muestras de sangre entera de cada individuo se diluyeron en RPMI (1/20, v/v). Luego, se tomaron 100 µl de esa dilución y se mezclaron con 4 µl de la solución de fluorocromos, se dejó incubando 15 minutos y luego fueron examinadas bajo microscopio de fluorescencia Arcano L2001B YL a 400X para la determinación de la viabilidad. Se contabilizó un total de 100 células por muestra de sangre) y se determinó el porcentaje de células viables (verde) y necróticas (naranjas).

2.2.4.1. Puesta a punto del protocolo para *S. merianae*

Teniendo en cuenta que en la bibliografía consultada no se encontraron trabajos previos en los que se aplicara el EC en *S. merianae*, se llevó a cabo un estudio preliminar usando un protocolo previamente establecido para eritrocitos de otra especie reptiliana (*Caiman latirostris*; Poletta *et al.*, 2008). El objetivo fue evaluar parámetros críticos del ensayo de manera de obtener las condiciones adecuadas para trabajar con la especie: densidad celular, tiempo para el desenrollamiento de la doble hélice de ADN (*unwinding*) y tiempo de electroforesis, que permitieran la migración adecuada de los fragmentos de ADN cuando se hubiera producido un daño evidenciable en sangre de iguana y así detectarlo mediante el EC.

Como puesta a punto de la metodología que se implementaba por primera vez, se realizó una exposición *in vitro* de las muestras de sangre entera (n=6) a H₂O₂ como agente inductor de daño genotóxico. Las muestras sanguíneas fueron diluidas 1/20 (v/v) con RPMI 1640 y expuestas durante 30 minutos a concentraciones crecientes de H₂O₂ (10 µM, 25 µM y 50 µM), de manera de inducir daño en el material genético, mientras que en el control negativo se utilizó agua destilada (ver Anexo 2.1). Al finalizar la exposición, se tomaron 3 µl de dicha dilución y se mezclaron con 200 µl de agarosa de bajo punto de fusión (BPF). El volumen de suspensión celular mencionado fue elegido de acuerdo al protocolo de referencia, y considerado como el volumen óptimo a testear en este ensayo. Se realizaron dos preparados por muestra de cada individuo. Los portaobjetos utilizados contenían al momento de la siembra, una capa deshidratada de agarosa de punto de fusión normal (PFN) sobre la cual se colocó la agarosa BPF con las células en suspensión (Anexo 2.1), y se cubrió con cubreobjetos de 24 x 50 mm. Posteriormente, se llevó a frío de heladera durante 10 minutos para solidificar la agarosa y, por último, se retiró el cubreobjeto por presión cuidadosamente y se aplicó en cada portaobjeto la tercera capa con 100 µL agarosa BPF. Para permitir la ruptura de las membranas celulares los preparados se dejaron inmersos en una solución de lisis por un período mínimo de una hora y máximo de una semana. Cumplido ese tiempo, los preparados se incubaron en la solución de electroforesis para permitir el *unwinding* y luego, se aplicó la electroforesis en la misma solución a

300 mA y 25 V (0,90 V/cm) (ver Anexo 2.1). Se testearon diferentes tiempos: 5, 10 y 20 minutos de *unwinding*, y 5, 15 y 20 minutos de electroforesis. Debido a que esta etapa del EC es sensible a la luz, se trabajó al resguardo de la misma para evitar que se generara daño adicional en el ADN. Finalizado el tiempo de electroforesis, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con buffer de neutralización (Anexo 2.1). Como último paso, se llevó a cabo la deshidratación de los preparados con etanol durante 5 minutos para asegurar su conservación.

Todos los portaobjetos fueron codificados a ciegas para mantener la objetividad en el posterior análisis de los preparados. Al momento de la lectura, los preparados fueron teñidos con BE (2 mg/ml; Anexo 2.1) y se seleccionaron 100 imágenes al azar por individuo (50 por cada réplica) bajo microscopio de fluorescencia Leica DMLB con una magnificación de 400X. Los cometas (nucleoides) se clasificaron visualmente en 5 categorías de acuerdo al tamaño de la cola y la intensidad de la imagen (Fig. 2.7).

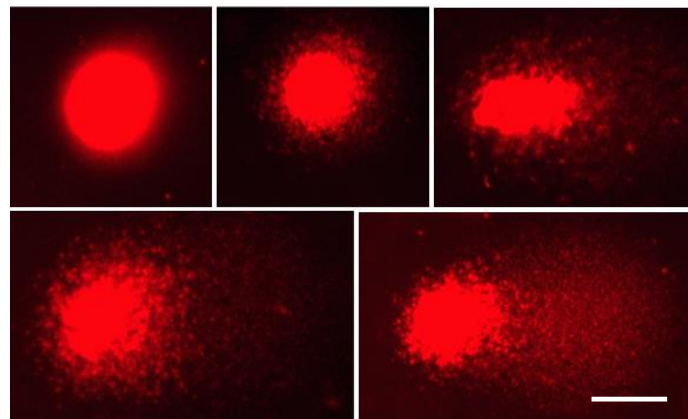


Figura 2.7. Diferentes niveles de daño al ADN (0-4) que pueden ser detectados con el ensayo cometa. La figura muestra nucleoides observados en muestras de sangre periférica de *S. merianae*, teñidas con BE. Magnificación de 400X. Barra= 10 μ m. Fotos tomadas por L.G. Schaumburg.

Posteriormente, se calculó el índice de daño de cada muestra mediante la siguiente fórmula: $ID = 1 n_1 + 2 n_2 + 3 n_3 + 4 n_4$, donde n_x es la cantidad de nucleoides por cada categoría de daño (Poletta *et al.*, 2008).

2.2.4.2. Determinación del Índice de Daño Basal (IDB)

Una vez lograda la puesta a punto de la técnica para su aplicación a eritrocitos de *S. merianae*, se llevó a cabo la determinación del IDB para la especie. Para esto, se utilizaron las muestras de sangre entera de los animales de las 3 edades antes referidas.

2.2.5. ENSAYO DE MICRONÚCLEO

2.2.5.1. Puesta a punto del protocolo para *S. merianae*

El ensayo de MN no requirió de modificaciones ya que las condiciones técnicas son sencillas, y se disponía del protocolo previamente ajustado para otra especie reptiliana, *Caiman latirostris*, llevado a cabo por Poletta *et al.* (2008). Se realizaron dos extendidos por cada muestra de sangre entera de los animales (n=6). Se dejaron secar al aire y se fijaron con etanol durante 10 minutos. La tinción se realizó con Giemsa al 10 % en agua estabilizada (Anexo 2.1) durante 10 minutos. La solución de Giemsa se preparó en fresco, se centrifugó durante 20 min a 3000 rpm y se filtró antes de la tinción para reducir las precipitaciones del colorante sobre los extendidos y evitar interferencias en la lectura de los MNs. Los extendidos fueron codificados y examinados a ciegas bajo microscopio óptico Olympus CX21 a 1000X. Los criterios para la identificación de los MNs se basaron en los parámetros establecidos por Schmid (1975) descriptos en el apartado 2.1.1.2.

2.2.5.2. Determinación de la Frecuencia basal de MN (FBMN)

Una vez lograda la puesta a punto de la técnica acorde a los eritrocitos de *S. merianae*, se llevó a cabo la determinación de la FBMN en los ejemplares de las 3 edades antes referidas. Para esto, se contabilizó un total de 1000 eritrocitos por cada animal entre los 2 extendidos realizados (500 células de cada uno), y se registró la frecuencia individual de MNs (FMN) como:

FMN: cantidad de eritrocitos visualizados con MN/1000 eritrocitos contabilizados.

2.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este análisis se realizó mediante el software SPSS 17.0. Se testeó la normalidad y la homogeneidad de varianzas de todos los datos obtenidos en este Capítulo mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente. Los valores de cada variable analizada se expresaron como la media \pm el desvío estándar (DE).

En la etapa de puesta a punto del EC, los datos fueron analizados mediante un ANOVA seguido del test de Tukey para comparar el Índice de Daño generado por los grupos de muestras tratadas con H₂O₂ (10 μ M, 25 μ M y 50 μ M) respecto del control negativo.

En la etapa de determinación de valores basales, se aplicó el test *T Student* para comparar la FBMN y el IDB entre machos y hembras en el grupo de los adultos. Se aplicaron los estadísticos no paramétricos, el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney, para la comparación de la FBMN y el IDB entre grupos de edades y nidos de origen. Se aplicó la corrección de Bonferroni de acuerdo al número de análisis por pares realizados, de modo que el valor de "*p*" considerado estadísticamente significativo fue de $p < 0,016$. En el análisis de la variabilidad en relación al nido, los adultos no fueron incluidos debido a la falta del dato del nido de origen. La relación entre la FBMN y el IDB con los parámetros de morfometría (peso y LHC) de todos los animales se evaluó mediante una regresión lineal o cuadrática, considerando en este caso como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO COMETA

La viabilidad celular de todas las muestras de *S. merianae* analizadas (ensayo *in vitro* y valores basales) se mantuvo en un rango del 95-100%, indicando que las condiciones aplicadas fueron apropiadas para este tipo de población celular.

En cuanto a los tiempos de *unwinding* y electroforesis evaluados luego del ensayo *in vitro*, la comparación de la extensión de la migración del ADN de los nucleoides entre las muestras tratadas

y el control, indicó que el período de 5 minutos de *unwinding* y electroforesis no fue suficiente para generar una migración adecuada de los fragmentos de ADN de las células dañadas, por lo que las colas de los cometas mostraron una migración mínima, incluso en las muestras tratadas con las dos concentraciones más altas de H₂O₂. Por el contrario, la prueba de 20 minutos para ambos procesos puso en evidencia que la mayoría de las células dañadas mostraban una excesiva migración de las colas de los cometas y una separación inadecuada de las cabezas de los nucleoides respecto de las colas, por lo que no fueron contabilizados. En ambos casos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones analizadas y el control ($p > 0,05$; Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Índice de daño (media ± DE) al ADN en eritrocitos de *S. merianae* a dos tiempos de *unwinding* y electroforesis.

Concentraciones de H ₂ O ₂	Prueba 5/5 minutos	n	Prueba 20/20 minutos	n
Control	106,00 ± 0,00	3	115,00 ± 9,90	3
10 µM	101,50 ± 2,12	3	129,50 ± 2,12	3
25 µM	104,00 ± 0,00	3	142,00 ± 12,72	3
50 µM	101,50 ± 2,12	3	136,50 ± 9,19	3
Sig. de Tukey (p)	0,124		0,138	

Por el contrario, en las muestras tratadas para la prueba de **10 min para el *unwinding* y 15 min para la electroforesis** mostraron nucleoides con formas características de cometas, revelando el daño generado por el compuesto en estudio. Se observó un mínimo de migración de las colas de los cometas en las muestras del control negativo tal como se esperaba ante la ausencia de exposición a un agente genotóxico. Los resultados mostraron un incremento estadísticamente significativo en el daño al ADN en las tres concentraciones de H₂O₂ probadas, 10 µM, 25 µM y 50 µM (178,5 ± 24,75; 173 ± 17,32; 187,67 ± 32,35, respectivamente) en comparación con el control negativo (119 ± 24,04; $p < 0,05$), aunque no se observó una relación dosis–respuesta (Fig. 2.8).

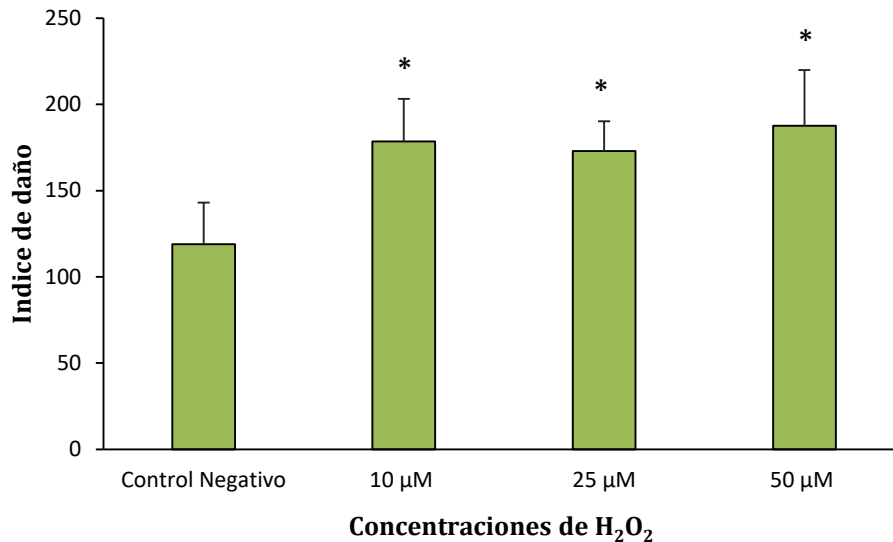


Figura 2.8. Índice de daño (media \pm DE) obtenido en la prueba de 10 min de *unwinding* y 15 min de electroforesis del Ensayo Cometa en eritrocitos de la iguana overa expuestos *in vitro* a 3 concentraciones de H₂O₂ y el control negativo (n= 3 en cada grupo). *Diferencias estadísticamente significativas respecto del control negativo ($p < 0,05$; ANOVA y test de Tukey).

2.3.2. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE MICRONÚCLEO

El protocolo del Ensayo de MN y los mínimos ajustes aplicados en la preparación del colorante Giemsa que se utilizó para teñir los extendidos, evitando la presencia de residuos de colorante que pudieran generar confusión en la lectura de los extendidos, resultaron exitosos para una visualización correcta de los MNs en los eritrocitos de la iguana overa (Fig. 2.9).

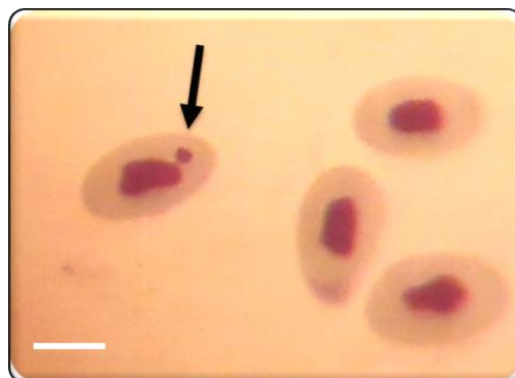


Figura 2.9. Eritrocitos de sangre periférica de *S. merianae*, donde se muestra la presencia de un MN (flecha; 1000X). Barra= 20 μ m.

2.3.3. TASA DE DAÑO BASAL EN FUNCIÓN DE LA EDAD

Los valores individuales como las medias de los parámetros morfométricos, la FBMN y el IDB determinados para neonatos se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Valores morfométricos y de genotoxicidad basal en neonatos de *S. merianae*.

Nro	LHC (cm)	Peso (g)	FBMN	IDB
1	9,00	17,50	0,00	156,00
2	8,70	16,90	0,00	156,00
3	8,40	17,80	0,00	142,00
4	8,30	17,00	0,00	142,00
5	8,50	17,70	0,00	164,00
6	8,50	17,50	1,00	160,00
7	8,50	16,90	0,00	154,00
8	8,60	18,20	0,00	114,00
9	8,90	20,20	0,00	140,00
10	8,50	19,30	0,00	140,00
11	8,80	18,10	0,00	122,00
12	8,80	20,10	0,00	184,00
13	8,00	15,90	0,00	167,00
14	8,60	19,20	0,00	132,00
15	8,60	18,70	0,00	172,00
16	8,30	17,10	0,00	134,00
17	8,30	15,50	0,00	110,00
18	8,50	16,40	0,00	112,00
19	8,80	17,60	0,00	145,00
20	8,40	15,00	1,00	162,00
21	8,30	15,70	1,00	145,00
22	8,50	15,50	0,00	169,00
23	8,20	14,40	1,00	119,00
24	8,60	17,20	0,00	168,00
X ± DE	8,52 ± 0,23	17,31 ± 1,53	0,16 ± 0,38	146,21 ± 20,68

Nro: número de animal; **LHC:** Longitud hocico-cloaca; **cm:** centímetros; **g:** gramos; **IDB:** Índice de daño basal; **FBMN:** Frecuencia basal de micronúcleos; **X:** media; **DE:** desvío estándar.

Los valores individuales como las medias de los parámetros morfométricos, la FBMN y el IDB determinados para juveniles se presentan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Valores morfométricos y de genotoxicidad basal en juveniles de *S. merianae*.

Nro	LHC (cm)	Peso (g)	FBMN	IDB
1	16,00	135,00	1,00	103,00
2	16,60	186,00	0,00	103,00
3	16,20	169,00	1,00	101,00
4	21,00	400,00	0,00	104,00
5	20,00	336,00	0,00	104,00
6	20,00	329,00	2,00	109,00
7	17,50	213,00	0,00	106,00
8	20,30	352,00	1,00	102,00
9	17,20	175,00	0,00	104,00
10	20,30	350,00	1,00	112,00
11	17,00	213,00	0,00	104,00
12	18,00	282,00	0,00	102,00
13	17,00	191,00	0,00	106,00
14	16,00	125,00	0,00	108,00
15	17,00	260,00	0,00	100,00
16	20,50	330,00	0,00	105,00
17	18,00	285,00	0,00	106,00
18	20,80	390,00	0,00	104,00
19	20,20	348,00	0,00	101,00
20	18,00	199,00	0,00	108,00
21	18,10	270,00	0,00	102,00
X ± DE	18,37 ± 1,74	263,71 ± 85,12	0,29 ± 0,56	104,5 ± 2,98

Nro: número de animal; **LHC:** Longitud hocico-cloaca; **cm:** centímetros; **g:** gramos; **IDB:** Índice de daño basal; **FBMN:** Frecuencia basal de micronúcleos; **X:** media; **DE:** desvío estándar.

Los valores individuales como las medias de los parámetros morfométricos, la FBMN y el IDB determinados para adultos se presenta en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Valores morfométricos y de genotoxicidad basal en adultos de *S. merianae*.

Nro	Sexo	LHC (cm)	Peso (g)	FBMN	IDB
1	♂	46,00	4700,00	5,00	116,00
2	♂	40,00	3510,00	1,00	110,00
3	♂	47,00	4440,00	1,00	102,00
4	♂	44,00	3840,00	2,00	111,00
5	♂	40,50	3490,00	1,00	100,00
6	♂	47,00	4350,00	0,00	101,00
7	♂	40,50	3340,00	2,00	102,00
8	♂	51,50	8000,00	1,00	104,00
9	♂	48,00	5530,00	0,00	100,00
10	♀	46,50	5420,00	0,00	105,00
11	♀	43,50	3180,00	0,00	102,00
12	♀	37,50	2190,00	2,00	108,00
13	♀	39,00	2930,00	0,00	104,00
14	♀	39,00	2650,00	1,00	100,00
15	♀	40,00	3180,00	0,00	102,00
16	♀	38,00	2500,00	1,00	104,00
17	♀	39,50	3000,00	1,00	100,00
18	♀	39,00	2930,00	1,00	102,00
19	♀	37,50	2300,00	0,00	100,00
20	♀	39,00	2800,00	0,00	104,00
X ± DE		42,15 ± 4,16	3714 ± 1391,74	0,95 ± 1,19	103,85 ± 4,32

Nro: número de animal; **LHC:** Longitud hocico-cloaca; **cm:** centímetros; **g:** gramos; **IDB:** Índice de daño basal; **FBMN:** Frecuencia basal de micronúcleos; **X:** media; **DE:** desvío estándar.

En iguana overa la comparación de la FBMN y el IDB entre las tres edades evaluadas mostró diferencias estadísticamente significativas, poniendo en evidencia que la edad es un factor a tener en cuenta a la hora de realizar estudios de genotoxicidad en esta especie. La FBMN reveló una diferencia estadísticamente significativa sólo entre adultos y neonatos ($0,95 \pm 1,19$ vs. $0,16 \pm 0,38$, respectivamente; $p= 0,002$). En cambio, entre juveniles y neonatos no se encontró diferencia significativa alguna para la FBMN ($0,29 \pm 0,56$ vs $0,16 \pm 0,38$, respectivamente; $p > 0,016$), y entre juveniles y adultos, el estadístico mostró un valor de $p= 0,017$, muy cercano al valor crítico de significancia estadística ($p= 0,016$), por lo que, si bien no pudo ser considerado estadísticamente significativo, se observa una marcada tendencia (Fig. 2.10).

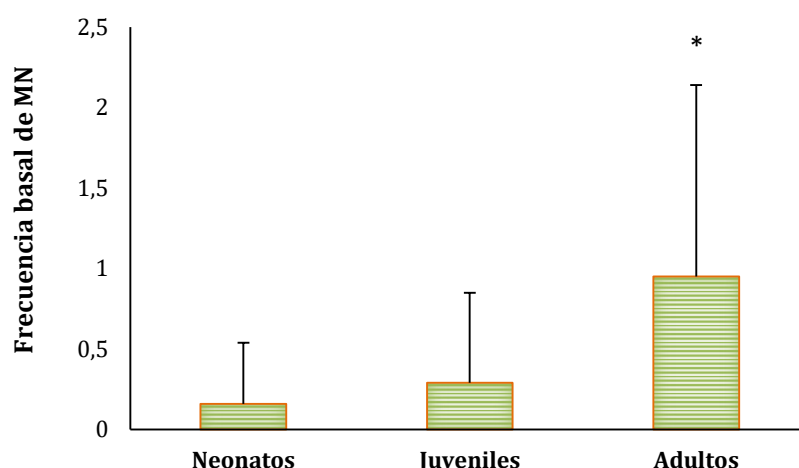


Figura 2.10. Frecuencia basal de MN (media ± DE) en individuos de *S. merianae* según el rango etario evaluado (24 neonatos, 21 juveniles y 20 adultos). *Estadísticamente significativo respecto de los neonatos ($p=0,002$; *test de Mann Whitney*).

Por el contrario, el EC reveló valores de IDB que fueron disminuyendo a medida que aumentaba la edad de los animales. El IDB de los neonatos ($146,21 \pm 20,68$) fue significativamente mayor al IDB de juveniles ($104,5 \pm 2,98$; $p < 0,001$) y de los adultos ($103,85 \pm 4,32$; $p < 0,001$). Al igual que lo detectado por el ensayo de MN, los valores de IDB entre los adultos y juveniles no registraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,201$; Fig. 2.11).

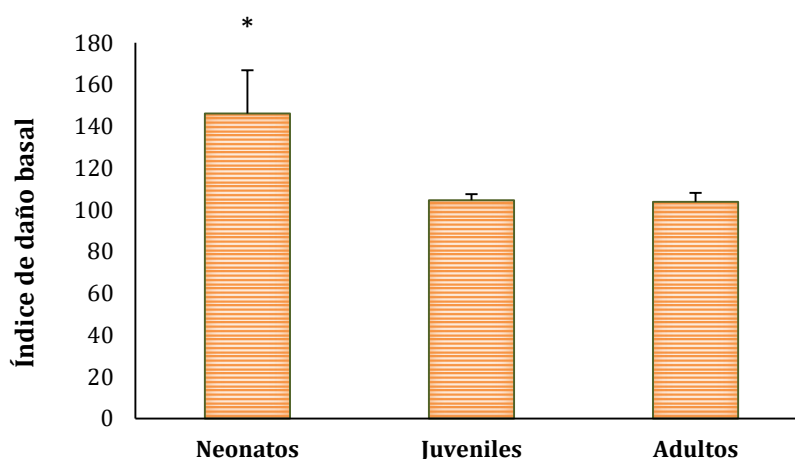


Figura 2.11. Índices de daño basal (media ± DE) obtenidos en las tres edades evaluadas de *S. merianae* (24 neonatos, 21 juveniles y 20 adultos). *Estadísticamente significativo respecto de juveniles y adultos ($p < 0,001$; *test de Mann Whitney*).

Se detectó una relación negativa débil estadísticamente significativa entre los valores de la FBMN y el peso de los neonatos, con un coeficiente de regresión lineal $R^2 = 0,245$ ($p = 0,014$) y de regresión cuadrática $R^2 = 0,368$ ($p = 0,008$). Por el contrario, no se detectó ninguna relación entre los parámetros morfométricos y el IDB para las edades estudiadas ($p > 0,05$).

2.3.4. TASA DE DAÑO BASAL EN FUNCIÓN DEL SEXO

Los valores de la FBMN, el IDB, el peso y la LHC obtenidos para los adultos de cada sexo de la iguana overa se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Valores (media \pm DE) morfométricos y de genotoxicidad basal de adultos de *S. merianae* según el sexo

Sexo	n	LHC (cm)	Peso (g)	FBMN	IDB
♂	10	45,10 \pm 3,78	4662,00 \pm 1404,05	1,30 \pm 1,49	105,10 \pm 5,44
♀	10	39,20 \pm 1,71	2766,00 \pm 347,31	0,60 \pm 0,70	102,60 \pm 2,50

♂: macho; ♀: hembra; LHC: Longitud hocico-cloaca; cm: centímetros; g: gramos; IDB: Índice de daño basal; FBMN: Frecuencia basal de micronúcleos. DE: desvío estándar.

Los valores basales no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al sexo de los animales adultos ($p > 0,05$), y tampoco se encontró relación lineal entre las medidas morfométricas, la FBMN y el IDB de estos individuos ($p > 0,05$).

2.3.5. TASA DE DAÑO BASAL EN FUNCIÓN DEL NIDO DE ORIGEN

En este análisis, los animales adultos no fueron incluidos por el desconocimiento del nido al que pertenecían. Los valores individuales de la FBMN e IDB de acuerdo al nido al que pertenecían los neonatos y juveniles se muestran en la Tabla 2.6. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en el nivel de daño basal para ninguno de los biomarcadores, entre los nidos utilizados en ambos grupos etarios ($p > 0,016$; Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Frecuencia de MN e Índice de daño basal (media \pm DE) en *S. merianae* según el nido de origen y la edad.

Nido	n	FBMN	IDB	Edad
I	8	0,12 \pm 0,35	148,50 \pm 15,99	neonatos
II	8	0,00 \pm 0,00	148,87 \pm 22,30	
III	8	0,37 \pm 0,52	141,25 \pm 24,70	
I	6	0,67 \pm 0,58	102,33 \pm 1,15	juveniles
II	10	0,31 \pm 0,63	105,08 \pm 3,20	
III	5	0,00 \pm 0,00	104,20 \pm 2,86	

FBMN: Frecuencia basal de micronúcleos; **IDB:** Índice de daño basal

2.4. DISCUSIÓN

A pesar de la creciente preocupación por la presencia de genotoxinas en el ambiente, hay una falta de validación de los métodos de ensayo que pueden ser utilizados con eficacia en la evaluación de la genotoxicidad y toxicidad asociada, en organismos silvestres en condiciones de relevancia ambiental (Jha, 2004). Por otro lado, las directrices de Entidades Internacionales aún no han incluido a representantes de cada grupo de vertebrados. Sin embargo, los biomarcadores abordados por primera vez en iguana overa en este trabajo de Tesis doctoral, el ensayo de MN y el EC, han ganado espacio en los últimos años mediante diferentes publicaciones en revistas de la especialidad sobre estudios de biomonitorio en especies silvestres, incluyendo tanto a peces (Crupkin *et al.*, 2013; Furnus *et al.*, 2014; Vera-Candiotti *et al.*, 2015; Bacchetta *et al.*, 2017; Iturburu *et al.*, 2018), anfibios (Yadav *et al.*, 2013; Lajmanovich *et al.*, 2014; Pollo *et al.*, 2015, 2019; Soloneski *et al.*, 2016; Curi *et al.*, 2017), reptiles (Capriglione *et al.*, 2011; Cabarcas-Montalvo *et al.*, 2012; Casini *et al.*, 2018; Sargsyan *et al.*, 2019), aves (Stončius y Lazutka, 2003; Skarphedinsdottir *et al.*, 2010; Shepherd y Somers, 2012; Baesse *et al.*, 2015; Quero *et al.*, 2016) como a mamíferos (Heuser *et al.*, 2002; Luaces *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2018). Estos trabajos demostraron la gran sensibilidad que poseen los biomarcadores para evidenciar los efectos no deseados de distintos contaminantes que se encuentran en los ambientes naturales donde habitan las especies estudiadas. En general, el ensayo de MN y EC suelen aplicarse en forma conjunta debido a que ofrecen la posibilidad de

caracterizaciones que se complementan entre sí al momento de interpretar los hallazgos (Ohe *et al.*, 2004), pudiendo detectar sustancias aneugénicas y clastogénicas con alta sensibilidad y potencia estadística (Araldi *et al.*, 2015), así como aquellas que ejercen alteraciones moleculares a nivel del ADN. Es fundamental la puesta a punto de los distintos ensayos para poder ser aplicados en una especie determinada y en particular cuando es por primera vez. En este contexto, la puesta a punto de ambos biomarcadores en eritrocitos de *S. merianae* nos ha permitido establecer los valores basales de daño para esta especie, que hasta el momento y en lo que hace a nuestro conocimiento, no presentaba datos de indicadores de genotoxicidad reportados en la literatura científica. En años anteriores al inicio de este trabajo doctoral, se desarrolló un protocolo adaptado a otra especie reptiliana de distribución natural en ecosistemas de Argentina, *C. latirostris* (Poletta *et al.*, 2008). Si bien las características del tejido sanguíneo son muy similares, fueron necesarios algunos ajustes metodológicos para que los ensayos de corto plazo pudieran aplicarse en *S. merianae* y permitieran la caracterización del daño genético espontáneo observable en la especie. En el ensayo de MN, particularmente no se realizaron cambios sustanciales más que los detalles y cuidados en la tinción que ya habían sido establecidos para el yacaré overo (Poletta *et al.*, 2008). Por su parte en el EC, los ajustes estuvieron dirigidos a determinar ciertas condiciones como la densidad celular y los tiempos de *unwiding* y electroforesis, ya que son características específicas para cada tipo celular y especie en estudio (Lee y Steinert, 2003; Knopper, 2005). En el desarrollo de estos ensayos se debe tener en cuenta la sensibilidad de los biomarcadores que, de acuerdo con la información brindada por la bibliografía, está vinculada a los diferentes tipos de daño genotóxico o puntos finales (en inglés, *endpoint*) que pueden detectar cada uno de ellos. Por otra parte, hay otros factores que tienen que ver con las características intrínsecas de las células sanguíneas como la vida media de los eritrocitos en circulación y el tiempo de remoción de la circulación de los eritrocitos dañados o envejecidos (Udroiu, 2006).

Teniendo en cuenta que las características fisiológicas de la especie influyen en los niveles basales de daño al ADN, conocer la posible incidencia de la edad y el sexo es fundamental (Gajski *et al.*, 2019; Møller, 2019) a la hora de entender la variabilidad intra e interindividual (Gajski *et al.*, 2018; Gajski

et al., 2019). Esta última puede estar relacionada con la vulnerabilidad y el estado nutricional de los organismos (Cuevas y Zorita, 2018). La implementación del ensayo de MN y EC para caracterizar el nivel de daño genético basal en eritrocitos de sangre periférica en ejemplares de iguana overa de edades diferentes propone resultados controversiales. La respuesta de los biomarcadores en torno a la edad de las iguanas mostró resultados opuestos, con un incremento de la FBMN y una disminución del IDB en función del incremento de la edad de los individuos de *S. merianae* (Figuras 2.10 y 2.11, respectivamente). En el caso de la FBMN, los organismos de menor edad mostraron valores más bajos ($0,16 \pm 0,38$) que los observados en juveniles ($0,29 \pm 0,56$) y adultos ($0,95 \pm 1,19$), siendo estos últimos estadísticamente diferentes respecto de los neonatos. Algunos estudios explican de forma general que el daño genético que se genera de manera espontánea a lo largo de los años de vida está asociado a la falta de eficiencia de reparación del daño en el ADN o bien a que el daño se acumula con el paso de los años aumentando la senescencia de las células (Luzhna *et al.*, 2013). Por el contrario, los resultados del EC mostraron una disminución en la generación de daño basal a medida que aumentaba la edad de las iguanas, con valores más altos en neonatos ($146,21 \pm 20,68$) en relación con las otras edades estudiadas (juveniles: $104,5 \pm 2,98$; Adultos: $103,85 \pm 4,32$). La diferencia estadísticamente significativa se encontró entre los ejemplares recién nacidos respecto de los individuos adultos. Estos resultados pueden deberse a la alta tasa metabólica y proliferación celular en los organismos en plena actividad de crecimiento desde la eclosión, favoreciendo al aumento del nivel de daño. Por otra parte, debe considerarse la inmadurez de los mecanismos de reparación específicos para los tipos de daños que pueden ser detectados por el EC en los animales de tan corta edad (Mudry y Carballo, 2006; Poletta *et al.*, 2011). En los animales juveniles y adultos, estas lesiones tienen altas probabilidades de ser reparadas en forma correcta por los sistemas de reparación del ADN, reduciéndose así el daño basal detectado. Por otra parte, entre estas dos clases etarias no hubo diferencias significativas e incluso presentaron valores muy similares de ID, lo cual podría indicar que la tasa de daño al material genético de las iguanas estudiadas se mantiene estable una vez superado el estadio de neonatos. Sería interesante realizar un seguimiento mensual o bimestral del nivel basal de daño de los animales desde su nacimiento hasta el primer año de vida, para determinar

a partir de qué momento se produce la reducción en los valores basales, en asociación con la madurez de los sistemas de defensa y reparación del daño. Este seguimiento no pudo realizarse durante el desarrollo de la presente Tesis doctoral.

De acuerdo a conocimientos previos en otras especies reptilianas, los resultados observados en juveniles y adultos de la iguana overa fueron similares a los valores determinados en ejemplares juveniles de 4 meses (FBMN: $0,87 \pm 0,19$ / IDB: $103,40 \pm 0,86$) y 10 meses de vida (FBMN: $1,04 \pm 0,18$ / IDB: $120,08 \pm 2,22$) de yacaré overo, *Caiman latirostris* (Poletta *et al.*, 2008), otro reptil que habita en las mismas regiones fitogeográficas que la iguana overa. En función de los resultados antes mencionados, ambas especies reptilianas coinciden en la ausencia de diferencia significativa en las FBMN entre ejemplares de distinta edad, a partir del estadio de juveniles y hasta adultos. Mientras que el IDB en el yacaré overo mostró diferencias entre los ejemplares de las edades evaluadas. Es posible que la diferencia de edades de los animales utilizados no fuera lo suficientemente grande como para ejercer una influencia sustancial en la generación de MN en estas especies característicamente longevas. Por otra parte, en ninguna de las dos especies se encontró relación alguna entre los valores basales y el sexo o la longitud de los individuos evaluados, mientras que el peso sólo evidenció una relación débil en el caso de las iguanas. Un estudio reciente observó resultados similares a los hallados en la presente tesis, en el que la FBMN no presentó variaciones entre animales juveniles (de 1 año) y adultos (más de 3 años) de dos especies de lagartos *Darevskia raddei* y *D. armeniaca*. Sin embargo, el nivel de daño basal disminuyó con la edad de los ejemplares estudiados (Sargsyan *et al.*, 2018). En el trabajo de Schwanz *et al.* (2011) también observaron que las crías de la tortuga *Chrysemys picta* presentaban niveles más altos de daño basal al ADN que los juveniles y adultos, no obstante, estos mostraron un mayor grado de eficiencia de reparación del daño. Otro antecedente interesante de mencionar es un estudio realizado en dos subespecies de camaleones que habitan en ambientes diferentes en Egipto, donde los niveles basales de MN en las células sanguíneas fueron similares entre *Chamaeleo chamaeleon chamaeleon* y *C. c. musae*, aunque la primera subespecie mostró un valor ligeramente mayor que la segunda. El EC aplicado en células hepáticas evidenció un nivel de daño basal similar en ambas subespecies; mientras que en células

sanguíneas el EC detectó un valor significativamente mayor en el porcentaje de ADN y en el momento de la cola de los cometas en la subespecie *C. c. musae* respecto de *C. c. chamaeleon* (Mohamad y Kadry, 2014). Es de destacar la importancia de aplicar más de un biomarcador para tener una caracterización acabada del daño no sólo teniendo en cuenta la sensibilidad de la especie sino la potencialidad de los ensayos para evidenciar daño. En relación a otros vertebrados, nuestros resultados se asemejarían más con lo que se observó en un estudio realizado en ejemplares de palomas silvestres (*Columba livia*), donde los juveniles mostraron una FMN tres veces menor que los adultos (Shepherd y Somers, 2012). En cambio, algunos trabajos en mamíferos reportaron una FBMN mayor en neonatos y juveniles en comparación con los animales más viejos (Zúñiga-González *et al.*, 2000, 2001a, 2001b; Heuser *et al.*, 2008). En este último trabajo se reportaron valores de IDB que aumentaban progresivamente en función de la edad de los ratones estudiados, en contraposición a lo observado por la FBMN (Heuser *et al.*, 2008). Considerando que se dispone de poca bibliografía en reptiles, una posible interpretación de nuestros resultados frente a estos estudios es que la aparición de células micronucleadas en iguanas de diferentes edades tiende a comportarse de manera opuesta a lo observado en otras especies de vertebrados e incluso, en otros reptiles. Algunos autores sugieren que el incremento de la FBMN en adultos podría ser resultado de una combinación de factores, incluyendo el efecto acumulativo de mutaciones adquiridas por genes implicados en la reparación del ADN, errores en la mecánica involucrada en la segregación cromosómica, y/o deficiencia en los puntos de control del ciclo celular (Fenech y Bonassi, 2011; Guo *et al.*, 2019). Otro estudio indica que, el daño, además de ser acumulativo, refiere que la tasa de producción de las mutaciones también aumenta con la edad (Wojda *et al.*, 2007). Un trabajo reciente revela que el incremento de MN con la edad de los individuos se debe a la disfunción general de la maquinaria mitótica (Macedo *et al.*, 2018). Esto explicaría por qué las poblaciones celulares son menos capaces de reparar el daño genético a medida que los individuos envejecen (Heuser *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2008), aumentando la susceptibilidad genética de los organismos a la acción de cualquier xenobiótico (Jackson y Loeb, 2001; Bhilwade *et al.*, 2014). Por otra parte, las diferencias en la FBMN observadas entre las especies

pueden ser causadas por variaciones en la eficiencia de eliminación de eritrocitos micronucleados (Zúñiga González *et al.*, 2001a).

El sexo como factor de variación corresponde a una de las variables demográficas más importantes que impactan sobre la frecuencia de MN (Gajski *et al.*, 2018). En nuestro modelo reptiliano, los hallazgos mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas en la FBMN ni en el IDB de acuerdo al sexo de las iguanas. Al analizar los datos se observa que la FBMN en las iguanas machos ($1,30 \pm 1,49$) es el doble de la observada en las hembras ($0,60 \pm 0,70$), sin embargo la ausencia de diferencia estadística puede deberse a dispersión de los datos de FBMN en el grupo de machos, con un rango de valores de entre 0 y 5/1000. Resultados similares fueron reportados en ejemplares de lagartos *Darevskia* (Sargsyan *et al.*, 2019), en tortugas *Chrysemys picta* (Schwanz *et al.*, 2011), en serpientes *Hierophis gemonensis* (Strunjak-Perovic *et al.*, 2010) y en el lenguado común *Solea solea* (Cuevas y Zorita, 2018). No obstante, los estudios realizados en algunos mamíferos e incluso en el ser humano, muestran resultados opuestos. En ratones de 1 y 18 meses de edad, las hembras manifestaron mayores niveles basales de daño que los machos (Bhilwade *et al.*, 2014). En linfocitos humanos, la FBMN tendió a ser mayor en mujeres en comparación con hombres (Fenech y Bonassi, 2011) y en las más longevas predominaban MNs que contenían cromosomas enteros (Bakou *et al.*, 2002). Sin embargo, una reciente revisión bibliográfica indica que los hombres presentan mayores niveles de daño al ADN medido por el EC que las mujeres (Møller, 2019). Es evidente que la literatura es muy escasa aún para establecer generalizaciones y, en este contexto, nuestra contribución amplía el espectro de observaciones a tener en cuenta al momento de analizar edades, sexo e inferencias de daño frente a xenobióticos evaluados por ensayo de MN y EC.

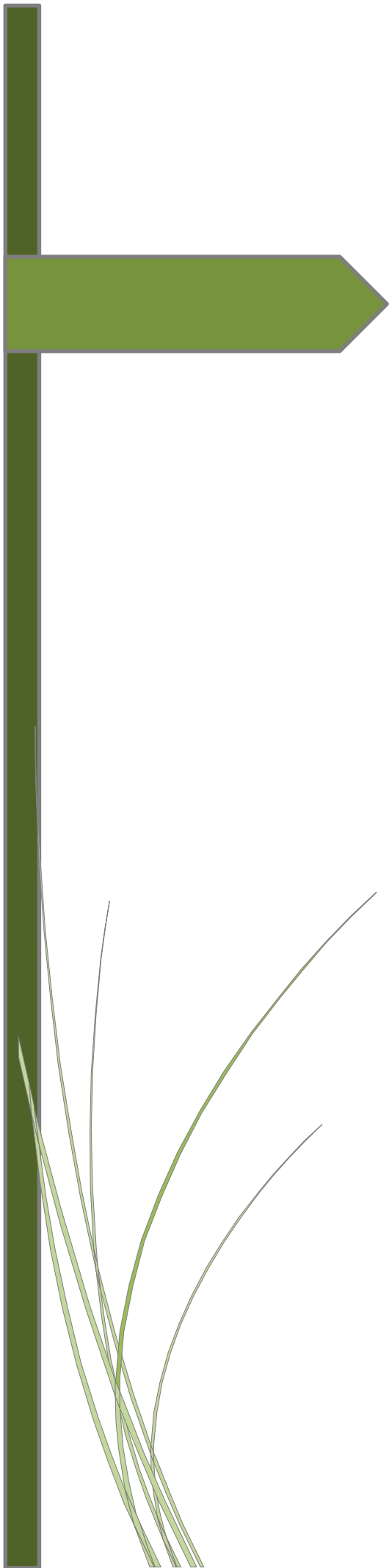
En cuanto al análisis de otras variables que pudieran influir en los biomarcadores, al considerar el nido de origen, nuestros resultados indican que no hubo efecto nido sobre los niveles basales de daño al ADN en neonatos y juveniles de la iguana overa, es decir que las respuestas de los biomarcadores fueron independientes del nido del cual provenían los individuos utilizados para las evaluaciones descritas en este Capítulo. Estos datos coinciden con los reportados para *C. latirostris* en los primeros trabajos del grupo de investigación considerando evaluaciones de genotoxicidad y

su relación con respuesta inmunológica (Poletta *et al.*, 2009, 2011; Latorre *et al.*, 2013). Sin embargo, en un trabajo más reciente, López González *et al.* (2017) demostraron una influencia del nido sobre la FMN en ejemplares de yacaré overo. En cocodrilianos, el efecto nido ejerció una fuerte influencia sobre el peso y la longitud de los neonatos de *C. latirostris* (Piña y Larriera, 2002; Marques *et al.*, 2016) y *Crocodylus porosus* (Turton *et al.*, 1997) Esta diferencia con lo observado en iguana overa en este trabajo de Tesis pone en evidencia que el "nido de origen" es un factor variable que debe ser controlado a la hora de diseñar los estudios en especies reptilianas, dado que a veces influye y otras veces no por lo que puede tener una incidencia directa en los resultados observados si no se lo trata apropiadamente. En otros vertebrados como las aves, cuyo modo de reproducción podría asimilarse al de *S. merianae*, la bibliografía consultada revela que no se contempla la influencia de este tipo de factor sobre posibles indicadores de daño genotóxico (Stončius y Lazutka, 2003; Skarphedinsdottir *et al.*, 2010; Shepherd y Somers, 2012; Quero *et al.*, 2016). Por el contrario, el efecto nido sí fue estudiado en relación con otras variables. Por ejemplo, en el pez cebra (*Danio rerio*) se observó que el efecto nido puede afectar el patrón de desarrollo embrionario en el rendimiento cardíaco y la concentración de células sanguíneas (Schwerte *et al.*, 2005), al igual que en la rana *Eleutherodactylus cooki* (Burggren *et al.*, 2015).

La iguana overa como modelo biológico para estudios de este tipo presenta algunas ventajas, entre ellas, la posibilidad de disponer de muestras en cualquier momento del año de los animales criados en el marco del "Proyecto Iguanas". Por otra parte, al poseer la iguana eritrocitos nucleados se simplifica la aplicación de las pruebas de genotoxicidad seleccionadas como biomarcadores para este trabajo de Tesis, incluso por la facilidad de obtención de sangre periférica. Esta característica en la serie roja evita los procedimientos complejos asociados al cultivo de células como sucede en otro tipo de población celular, por ejemplo, la de linfocitos en las especies mamíferas. Al mismo tiempo impide que los animales sean sacrificados para la obtención de la muestra, como es el ejemplo de roedores u otros mamíferos pequeños que para aplicar el ensayo de MN es más frecuente utilizar la médula ósea, por el escaso rendimiento en células de la serie blanca rescatables del escaso volumen de sangre extraída por la baja volemia de los especímenes. Respecto del estado de salud de los ejemplares

utilizados para este trabajo, es importante mencionar que todos los individuos se encontraban en un estado saludable según el diagnóstico de los veterinarios. Por su parte, la incubación de los huevos correspondientes a los neonatos utilizados como la crianza de los juveniles bajo condiciones controladas durante todo el período previo a la obtención de las muestras (es decir, en el primer año de vida), garantizó la no contaminación de los animales y el mantenimiento de los valores fisiológicos específicos de la especie, motivos por los cuales se esperaba obtener valores bajos en el nivel basal de daño al ADN. Por lo tanto, podemos inferir que las diferencias observadas entre los ejemplares tanto en la FBMN como en el IDB reflejan una variación en la susceptibilidad de los animales de diferentes edades, particularmente en neonatos y adultos. De esta manera, la edad se constituye en un factor importante a considerar a la hora de realizar estudios genotóxicos en *S. merianae*.

A modo de conclusión podemos decir que los biomarcadores de genotoxicidad elegidos mostraron una sensibilidad apropiada y la utilización de los eritrocitos de *S. merianae* fue pertinente para establecer los valores basales de daño genético. Si bien el Ensayo de MN y EC no han sido validados aún bajo normas internacionales en especies silvestres tales como la iguana overa, sí podemos sostener que son metodologías prometedoras, pues pueden estandarizarse y repetirse en el mismo lugar o en ámbitos diferentes e incluso entre distintos equipos de trabajo, y discutir los hallazgos luego de aplicar idénticos protocolos. Nuestros resultados constituyen un aporte más a su aplicación con éxito en otras especies no mamíferas y, fundamentalmente en reptiles. De acuerdo a ellos podemos afirmar que la edad es un factor que provoca una variación en el daño al ADN basal en los eritrocitos de ejemplares de iguana overa, mientras que el nido de origen y el sexo de los animales no serían modificadores del daño basal, en las condiciones y en la población de iguanas utilizada en el presente trabajo de Tesis. Por otra parte, podemos decir que la iguana overa presenta características que la hacen apropiada como un organismo bioindicador que puede reflejar la calidad del ambiente, de tal manera que nos permitió considerarla como modelo biológico en el marco de esta Tesis doctoral y en futuras evaluaciones de genotoxicidad, ya sea en el caso de análisis experimentales de daño inducido en diseños *ex situ* como de otros vinculados al monitoreo de su ambiente natural propio de su distribución geográfica como especie de nuestra fauna autóctona.



CAPÍTULO III:

Exposición *in ovo* y efecto genotóxico inducido por plaguicidas

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. TOXICIDAD DE PLAGUICIDAS EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES

3.1.1.1. Ensayos de prueba y modelos animales

A lo largo de la historia humana distintos eventos en relación con el uso indebido de sustancias químicas fueron marcando el camino hacia la regulación de las mismas y la armonización internacional de las directrices reglamentarias (Alves-pimenta *et al.*, 2018a). La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drugs Administration*) creó los primeros lineamientos para el desarrollo de pruebas teratogénicas. Posteriormente, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OECD, del inglés *Organization for Economic Cooperation and Development*) estableció criterios para la clasificación de los formulados químicos según su potencial teratogénico, basado en una sólida evidencia epidemiológica y experimental (Cavieres, 2004). Antes de ingresar al mercado, las nuevas sustancias deben someterse a pruebas de toxicidad en distintos modelos biológicos para conocer si ejercen efectos sobre la reproducción o en el desarrollo y crecimiento de las crías durante períodos críticos de la gestación, de manera de garantizar la salud humana y la seguridad ambiental (Alves-Pimenta *et al.*, 2018a). Los protocolos se basan en un sistema de pruebas *in vitro* e *in vivo*, utilizando diferentes especies y concentraciones del compuesto con distintos tiempos de exposición a fin de definir si los efectos sobre los organismos en estudio son letales o subletales. Los sistemas de pruebas en animales experimentales para compuestos químicos se realizan teniendo en cuenta como criterio de prueba la DL₅₀ (dosis administrada a los organismos por vía oral, subcutánea o intraperitoneal, que produce un 50% de mortalidad) o CL₅₀ (concentración de un compuesto en el medio -aire, agua o suelo- en contacto con el organismo que produce la muerte del 50% de los animales en experimentación). Para la interpretación de los resultados y a los efectos prácticos también se fijan criterios en cuanto al tipo de exposición y para ello se proponen cuatro categorías tales como *aguda*, *subaguda*, *subcrónica* y *crónica*, en función al tiempo de vida media del organismo utilizado. La **exposición aguda** o de *corto plazo* se define como la exposición a un

compuesto en una única administración dentro de un periodo máximo de 96 horas, dependiendo del ciclo de vida del organismo en estudio. Los objetivos de las pruebas de toxicidad aguda son proporcionar una estimación de la toxicidad intrínseca de la sustancia expresada como una dosis o concentración letal (DL_{50} o CL_{50}) y determinar los efectos tóxicos evidentes como la mortalidad o cese total de movimiento. En peces, por ejemplo, se evalúa el CL_{50} a 24, 48, 72 y 96 h, de acuerdo con las directrices de la OECD TG 203 (OECD, 2019) y de C.1 de la UE (Unión Europea) (UE, 2019). En abejas (*Apis mellifera*) se utiliza la DL_{50} a 72 h para larvas (OECD TG 237), en lombrices se usa la CL_{50} a 48 h y 72 h por contacto con papel, y para la prueba de suelo artificial se usa la CL_{50} a 7 y 14 días (OECD TG 207), mientras que en aves se determina una DL_{50} a 14 días (OECD TG 223). De acuerdo con la UE, la toxicidad aguda en ecosistemas acuáticos debe realizarse en especies no mamíferas representantes de 3 niveles tróficos, se propone estudiar algas o plantas como productores primarios, *Daphnia magna* como consumidor primario y peces como consumidores secundarios (UE, 2019).

Por otro lado, la **exposición subaguda** se refiere a la exposición a una serie de concentraciones o dosis de una sustancia química durante un período relativamente corto (1 mes o menos), para obtener información sobre toxicidad generada después de la administración repetida y establecer la dosis o concentración para estudios subcrónicos. La **exposición subcrónica** puede durar diferentes periodos de tiempo, a partir de los 3 meses y/o durante un tiempo inferior al 10% de la vida media del animal empleado (Repetto Gimenez y Repetto Kuhn, 2009). En tanto que los estudios de **exposición crónica** a medio o largo plazo deben durar más de 6 meses, generalmente entre 1 y 2 años de exposición a dosis repetidas, y son similares a los estudios de exposición subcrónica. La toxicidad crónica en peces puede evaluarse de acuerdo a las directrices de la OECD y UE en embriones desde el óvulo recién fecundado hasta el final del periodo embrionario (TG 212, UE C.15), incluyendo al estadio larval (TG 210) y otro que evalúa el crecimiento en juveniles (TG 215, UE C.14). Los objetivos principales son conocer los efectos a largo plazo y establecer, para las especies analizadas, un NOAEL (nivel sin efectos adversos observables) y un LOAEL (nivel más bajo de efectos adversos observados), de manera tal de identificar y caracterizar el órgano u órganos específicos afectados por

el compuesto de prueba después de la administración repetida (Repetto Gimenez y Repetto Kuhn, 2009).

En el caso particular de los plaguicidas, en lo que hace a nuestro conocimiento, hasta el presente, hay dos diseños principales de estudio de la OECD que fueron aceptados, por un lado, la directriz 414 (OECD, 2001a), y por otro, un estudio de dos generaciones conocido como la guía 416 (OECD, 2001b). Las alteraciones orgánicas que se detectan pueden clasificarse en “niveles mayores” cuando involucra efectos adversos irreversible como la teratogenicidad, o “niveles menores” cuando se refiere al retraso en el desarrollo o cambios en el comportamiento (Pérez-Landeiro *et al.*, 2002). En el primer caso, involucra defectos estructurales (teratogénicos), o bien muerte embrionaria, abortos y toxicidad materna, e incluso puede involucrar modificaciones en el desarrollo puberal posterior. En el segundo caso, algunos de los posibles efectos que se detectan incluyen anomalías como retardo en el crecimiento, defectos funcionales, deterioro del desarrollo mental y físico postnatal (Peters y Piersma, 1990; Sullivan, 2006). Las pruebas de toxicidad en el desarrollo se realizan normalmente en especies de mamíferos como ratas, ratones y conejos, debido a la similitud de las vías de desarrollo y la organogénesis con la de los humanos (Alves-Pimenta *et al.*, 2018b). Sin embargo, en los últimos años se observó un interés creciente en el uso de organismos no mamíferos como los embriones de rana (Svartz *et al.*, 2016; Bonfanti *et al.*, 2018; Babalola *et al.*, 2019; Slaby *et al.*, 2019) y pez cebra (Stanley *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2011; Moon *et al.*, 2016; Lanzarin *et al.*, 2019) para las pruebas de toxicidad en el desarrollo de distintos plaguicidas (Pašková *et al.*, 2011; Wise, 2013).

3.1.1.2. Teratogénesis y/o Embriotoxicidad de Plaguicidas

Teratogénesis es un término que proviene del griego, “terato” y “genos” que significa nacimiento u origen de un monstruo. Se trata del desarrollo anómalo de un organismo, es decir toda alteración funcional, bioquímica o morfológica en un organismo vivo como producto de la incidencia de determinados factores durante el desarrollo embrionario (Conley y Richards, 2013). La susceptibilidad para sufrir daños no es igual en todos los estadios del desarrollo. El periodo más sensible involucra a los estadios iniciales que corresponden a la organogénesis, la formación de los

órganos que constituirá al organismo completo. La exposición a cualquier factor que afecte las condiciones normales de proliferación celular, diferenciación o apoptosis durante este periodo conlleva a altas probabilidades de generar efectos teratogénicos (Paskova *et al.*, 2013). Mientras que, si el patrón de respuesta último es la muerte embrionaria del organismo en formación, se consideraría estar ante un caso de efecto embriotóxico o embrioletal, no teratogénico (a menos que se establezca que la muerte se debió a una malformación estructural). La relación entre los efectos embriotóxicos y teratogénicos son complejas y varían según el tipo de agente, el tiempo de exposición y la dosis (Rogers y Kavlock, 2008).

Las anomalías congénitas, es decir adquiridas durante la embriogénesis, pueden tener componentes genéticos y/o ambientales (Sant’Anna *et al.*, 2013). Estos últimos pueden ser de tipo químico (variaciones de pH, térmicas o iónicas), físico (radiaciones UV, gamma), biológico (infecciones bacterianas, parasitarias) e incluso un estado carencial de nutrientes en las condiciones maternas (Klassen *et al.*, 2008; Conley y Richards, 2013; Calado y dos Anjos Pires, 2018). Se ha sugerido que para que un factor pueda ser considerado como teratogénico en humanos deben existir resultados de estudios tanto epidemiológicos como experimentales, mientras que en otras especies solo se requiere de resultados experimentales (*in vitro* o *in vivo*) y de monitoreo ambiental (Sheperd, 2002).

Más allá de los beneficios ofrecidos por los plaguicidas tanto para la agricultura como en actividades de importancia sanitaria, son innegables los efectos tóxicos que estos generan en cualquier organismo vivo expuesto. La mayor preocupación científica y pública ante la exposición a plaguicidas devino luego del conocimiento de la posible asociación con malformaciones congénitas en poblaciones silvestres, debido a los riesgos que estos implican para la salud tanto de especies silvestres como de las poblaciones humanas de las regiones donde se aplican o alcanzan sus efectos (Hu *et al.*, 2009; Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015; de Carvalho *et al.*, 2017).

El 80% de la producción agrícola argentina corresponde a cultivos de soja que involucra la presencia de varios tipos de plaguicidas, siendo los principales GLIF, CIP, ENDO hasta su prohibición en el año 2013 y clorpirifós (Solis *et al.*, 2017). Debido a que la CIP y el ENDO son insecticidas de

amplio espectro, se considera que ellos podrían interferir con los procesos metabólicos comunes para un gran grupo de organismos, manteniendo una baja selectividad de acción (Rimoldi *et al.*, 2012). Los hábitats naturales reciben generalmente mezclas químicas complejas de estos plaguicidas, resultando dificultosa la cuantificación del impacto de los mismos sobre el ambiente y las especies (Eisenreich y Rowe, 2013). Dado que los efectos subletales se considera que ocurren a concentraciones ambientales muy bajas, es muy importante su evaluación (Svartz *et al.*, 2016). En condiciones naturales, los embriones pueden exponerse por diferentes vías. En reptiles, las vías de exposición evaluadas incluyen la transferencia materna (Rauschenberger *et al.*, 2004b; Guirlet *et al.*, 2010; Stewart *et al.*, 2011), la inyección de dosis controladas directamente dentro del huevo (Talent *et al.*, 2002; Schnars *et al.*, 2011) o la topicación de concentraciones específicas sobre la superficie del huevo para que difunda pasivamente hacia el embrión a través de la cáscara (Marco *et al.*, 2004; Sparling *et al.*, 2006; Poletta *et al.*, 2011; Eisenreich y Rowe, 2013; Schaumburg *et al.*, 2016). En los diferentes casos, se evidenciaron escasos resultados de teratogénesis en los embriones por exposición a plaguicidas, aunque sí se observaron efectos en la salud general como bajo peso y menor talla al eclosionar y índice corporal reducido post-eclosión, así como genotoxicidad en las crías. Dependiendo del grupo químico al que pertenezcan los plaguicidas, se ha observado una amplia variedad de efectos subletales tales como toxicidad neurológica (Paganelli *et al.* 2010; Roy *et al.* 2016), endocrina (Pushpanjali *et al.*, 2005), del sistema inmune en distintas especies (Pushpanjali *et al.*, 2005; Latorre *et al.*, 2013), e incluso en los seres humanos (Ortega García *et al.*, 2005). En general, se asume que sólo las malformaciones congénitas, el retraso en el crecimiento embrionario, la muerte embrionaria o fetal y funciones deterioradas son consecuencias de la toxicidad **en el** desarrollo (Sullivan, 2006; Ujházy *et al.*, 2012), aunque puede también afectar el crecimiento postnatal, alterando el desarrollo normal de los organismos hasta la juventud (Sullivan, 2006; Alves-Pimenta *et al.*, 2018b). Por lo tanto, estos estudios tienen un valor agregado que implica evaluar desde las posibles consecuencias de la teratogénesis hasta la supervivencia y el comportamiento general del organismo (Svartz *et al.*, 2016). La mayoría de los casos de anomalías congénitas en reptiles fueron descritas principalmente en el Orden Escamoso (de Carvalho *et al.*, 2017).

En relación con las formulaciones tratadas en este Capítulo, varios estudios han demostrado que la CIP puede relacionarse con anomalías tales como retraso en el crecimiento y neurotoxicidad, síntesis de aductos en el ADN de los embriones de distintas especies (Andleeb, 2016), malformaciones esqueléticas en embriones de pollo (Mobarak y Al-Asmari, 2011; Uggini *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2018), múltiples malformaciones y alteraciones del comportamiento en larvas-embriones de anfibios (Agostini *et al.*, 2010; Biga y Blaustein, 2013), así como estrés oxidativo y apoptosis en larvas-embriones de pez cebra (Shi *et al.*, 2011). Las formulaciones de ENDO poseen una importante literatura en la que se caracteriza su potencial embriotóxico y teratogénico. Tal es el caso de la exposición de embriones de pollo que generó retraso en el crecimiento, malformaciones esqueléticas y orgánicas externas (Mobarak y Al-Asmari, 2011), en especies acuáticas y en los que se ha observado peroxidación lipídica y alteración en las actividades de distintas enzimas (Pašková *et al.*, 2011). En cuanto al GLIF, las formulaciones evaluadas demostraron su capacidad para inducir efectos toxicológicos agudos y crónicos, incluyendo genotoxicidad, citotoxicidad, disrupción hormonal, tanto en vertebrados superiores como en el ser humano (Gill *et al.*, 2018). En lo que hace a nuestra revisión bibliográfica, hasta el momento no hay registros de efectos teratogénicos. Teniendo en cuenta este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación de los efectos embriotóxicos y genotóxicos de los plaguicidas antes mencionados sobre embriones de *S. merianae* durante su desarrollo gestacional en condiciones controladas de laboratorio. Los resultados tanto positivos como negativos cobran gran importancia como referencia original para posteriores monitoreos de las poblaciones expuestas naturalmente a los plaguicidas.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. ORIGEN DE HUEVOS UTILIZADOS

Para esta etapa del estudio se utilizaron huevos embrionados de *S. merianae* de diferentes temporadas reproductivas, colectados en la Reserva Natural Manejada “El Fisco” como fuera mencionado en el apartado 2.2.1.2.

3.2.2. QUÍMICOS UTILIZADOS

3.2.2.1. Formulados de plaguicidas

-A base de Glifosato (Roundup® Full II): formulado líquido soluble en agua que contiene, como principio activo (p.a.) 66,2 % de la sal potásica de glifosato [sal monopotásica de N- (fosfometil) glicina, C₃H₇KNO₅P; CAS: 70901-12-1]. Es un producto de Monsanto, Argentina.

-A base de Endosulfán (Galgofan®): formulado líquido prácticamente insoluble en agua (0,32 mg/l), que contiene como p.a., 35 % de endosulfán (C₈H₆Cl₆O₃S; CAS 115-29-7). Es un producto de Chemotecnica, Argentina.

-A base de Cipermetrina (Atanor®): formulado líquido insoluble en agua (0,01 mg/l) compuesto por una mezcla de diferentes isómeros de cipermetrina al 25 % (C₂₂H₁₉Cl₂NO₃; CAS 52315-07-8). Es un producto de Atanor, Argentina.

3.2.2.2. Control positivo y de vehículo

- Ciclofosfamida (CF): utilizado como control positivo. Compuesto soluble en agua, incoloro. Es un producto de Fluka, CAS 6055-19-2.

- Etanol: utilizado como vehículo para la dilución de los formulados de ENDO y CIP.

3.2.2.3. Preparación de concentraciones evaluadas

Las soluciones madre de los plaguicidas se prepararon utilizando los formulados antes mencionados, diluyendo RU en agua destilada y los formulados de ENDO/CIP en etanol. A partir de éstas, se hicieron las diluciones en serie con el vehículo pertinente para cada tipo de formulado, a fin de obtener las concentraciones de aplicación tópica que se utilizaron en cada experimental mencionadas a continuación. Al inicio del trabajo de la presente Tesis, no existían datos de referencia de efecto genotóxico de estas formulaciones sobre *S. merianae*. En función de esto, se utilizaron concentraciones de referencia de RU, ENDO y CIP informados para otras especies de vertebrados que se resumen en la Tabla 3.1. Si bien las concentraciones de referencia utilizadas eran las disponibles en la bibliografía de trabajos bajo condiciones de laboratorio, estudios ambientales realizados

posteriormente en nuestro país reportaron valores de GLIF en sedimentos y suelos agrícolas que oscilan de 1500 a 5000 µg / Kg después de una aplicación (Peruzzo *et al.*, 2008; Aparicio *et al.*, 2013), valores similares se encontraron luego en sedimentos de los ríos Saladillo y Luján en el centro-este de Argentina (Ronco *et al.*, 2016). Otro estudio reportó concentraciones de CIP de 0,57 a 221 µg/kg y de ENDO entre 0,77 y 37,6 µg/kg, en sedimentos del fondo del río Carcarañá, afluente del Río Paraná (Etchegoyen *et al.*, 2017). Si esos valores fueron encontrados en sedimentos y suelos, puede esperarse que los huevos de nidos que están en cuevas al lado de un cultivo reciban concentraciones similares o en el mismo rango a las aplicadas en los ensayos, por medio de escorrentía, por el material de nido contaminado o incluso por aspersión directa y en repetidas ocasiones.

Tabla 3.1. Concentraciones de referencias utilizadas para determinar las concentraciones aplicadas en *S. merianae*

Compuesto	Concentraciones de Referencia	Especie utilizada	Referencia
Formulado de GLIF: Roundup®	50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 µg/huevo	Huevos de <i>Caiman latirostris</i>	Poletta et al. (2009)
ENDO (grado técnico, 96.3% pureza)	1,5, 150 y 1500 µg/huevo	Huevos de <i>C. latirostris</i>	Beldomenico et al. (2007)
CIP	1-1000 µg/huevo	Huevos de <i>Gallus domesticus</i> (pollo doméstico)	Anwar (2003)

En todos los casos, las concentraciones se ajustaron al peso promedio de los huevos de la iguana overa (20g). En el caso de la CF utilizada en el control positivo, no existían datos previos sobre la utilización de este compuesto en *S. merianae*. Sin embargo, es de amplio conocimiento que la CF es un agente genotóxico para diferentes especies, incluidos los reptiles (Poletta, 2011). Se decidió utilizar este compuesto en el control positivo debido a que produjo mayor daño genotóxico en los eritrocitos de la iguana overa en comparación con el peróxido de hidrógeno utilizado en la estandarización de los ensayos que se encuentran en el Capítulo II. La concentración de CF se determinó en base a datos ya publicados para otra especie reptiliana como es *C. latirostris*, y se tomó como referencia la concentración más baja utilizada, de 700 µg/huevo. Se ajustó al peso promedio de

los huevos de la iguana overa, por lo que la concentración inicial utilizada fue equivalente a 400 µg/huevo.

Todas las soluciones con las formulaciones a testear y los controles fueron aplicados por topicación en un volumen final de 25 µl.

3.2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS

3.2.3.1. Experimental A: exposición *in ovo* al formulado de glifosato (GLIF; Roundup® Full II)

3.2.3.1.1. Primer Experimental A (EA1)

Este primer experimental se llevó a cabo como exploratorio de un amplio rango de concentraciones del formulado de GLIF (Roundup® Full II) para determinar las concentraciones efectivas con efectos genotóxicos en *S. merianae* por exposición de los huevos durante su incubación. Para ello, se utilizaron 108 huevos provenientes de tres nidos de la temporada reproductiva 2012, que se distribuyeron al azar en 9 grupos experimentales donde cada uno constaba de una réplica. Cada réplica tenía un total de 6 huevos (2 de cada nido) por lo que el total de huevos por grupo experimental fue de 12. Se emplearon seis grupos expuestos a concentraciones diferentes de RU, un control negativo tratado con agua destilada sin contaminantes, y dos controles positivos con concentraciones diferentes de CF (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Grupos y concentraciones aplicadas en el primer experimental de exposición *in ovo* a RU (EA1).

Grupo experimental	Concentración	N réplica	N/grupo experimental
CP400	400 µg CF /huevo	6	12
CP200	200 µg CF /huevo	6	12
CN	25 µl H ₂ O destilada (vol.)/huevo	6	12
RU50	50 µg RU/huevo	6	12
RU100	100 µg RU/huevo	6	12
RU200	200 µg RU/huevo	6	12
RU400	400 µg RU/huevo	6	12
RU800	800 µg RU/huevo	6	12
RU1600	1600 µg RU/huevo	6	12

EA1: primer experimental A; **CP:** control positivo; **CN:** control negativo; **RU:** distintas concentraciones de la formulación comercial Roundup; **CF:** ciclofosfamida; **Vol.:** volumen aplicado; **µg:** microgramos; **N:** número.

Los huevos fueron colocados en bandejas de plástico, con una base de vermiculita húmeda y material vegetal del mismo nido como cubierta. En este experimental se utilizaron incubadoras construidas con bateas (75 cm x 35 cm x 37 cm) de poliestireno expandido (Fig. 3.1).



Figura 3.1. Incubadora utilizada para el Experimental A1 de exposición de huevos de iguana overa a distintas concentraciones de RU (GLIF 66,2 %). En la tapa se observa el foco de luz mediante el cual se le brindó calor. Barra= 10 cm.

La temperatura necesaria para la incubación de los huevos fue provista por la luz de un foco de 12W (Phillip ecoclassic 3H), a una distancia de 25 cm de las bandejas que contenían los huevos. La

incubación se llevó a cabo según las condiciones establecidas para la especie, mencionadas en el apartado 2.2.1.2. La exposición *in ovo* a RU se realizó por topicación (Crews et al., 1991) en un volumen final de 25 μL /huevo (Fig. 3.2), mediante una única aplicación durante la primera semana del desarrollo embrionario.

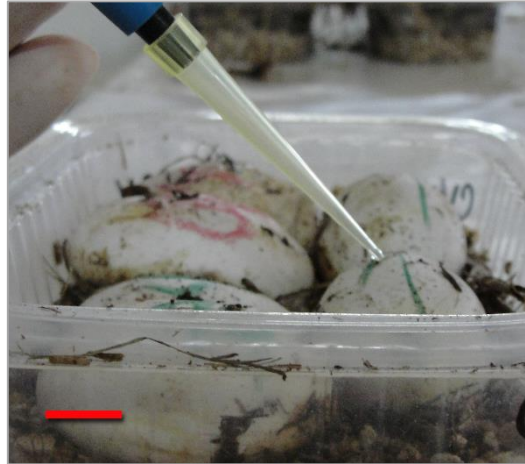


Figura 3.2. Aplicación tópica de concentraciones de RU sobre la cáscara en la cara superior del huevo de iguana overa. Barra = 1 cm.

Unos 15-20 días antes de la fecha estipulada para la eclosión, los huevos fueron envueltos en bolsas de tul de diferentes colores según el nido de origen (Fig. 3.3) con la finalidad de asegurar la identificación correcta de las crías nacidas en caso de producirse eclosiones simultáneas.



Figura 3.3. Huevos de iguana overa envueltos con tul para asegurar la correcta identificación de las crías al nacer. Barra= 1 cm.

3.2.3.1.2. Segundo Experimental A (EA2)

Este experimental se realizó con la finalidad de comprobar la repetividad de los resultados obtenidos en el EA1 y por ello se utilizaron las concentraciones determinadas como efectivas en el mismo.

Se aplicaron las mismas condiciones experimentales que en EA1 y se testearon cuatro concentraciones de RU, un CP con una concentración de CF a la mitad de la aplicada en EA1 debido a que la concentración de 400 µg CF/huevo produjo una mortalidad mayor a la esperada, y un CN (agua destilada). Para ello se utilizaron 72 huevos de tres nidos diferentes de la temporada reproductiva 2013, que fueron distribuidos equitativamente en los distintos GE y su réplica (4 huevos de cada nido por grupo, 2 por réplica). Es decir, que se mantuvo la misma cantidad de huevos por GE que en EA1 (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Grupos y concentraciones aplicadas en el segundo experimental de exposición *in ovo* a RU (EA2).

Grupo Experimental	Concentración	N /réplica	N/grupo experimental
CP200	200 µg CF /huevo	6	12
CN	25 µl H ₂ O destilada (vol.)/huevo	6	12
RU200	200 µg RU/huevo	6	12
RU400	400 µg RU/huevo	6	12
RU800	800 µg RU/huevo	6	12
RU1600	1600 µg RU/huevo	6	12

EA2: segundo experimental A; CP: control positivo; CN: control negativo; RU: distintas concentraciones de la formulación comercial Roundup; CF: ciclofosfamida; Vol.: volumen aplicado; µg: microgramos; N: número.

3.2.3.2. Experimental B: exposición *in ovo* al formulado de Endosulfán (ENDO; Galgofan®), al de Cipermetrina (CIP; Atanor®) y a la mezcla de estos plaguicidas

El objetivo de este experimental fue evaluar en neonatos de *S. merianae* la genotoxicidad de dos formulaciones comerciales de ENDO y CIP, en forma individual, y luego la de la mezcla de ellos en conjunto con la formulación de GLIF, posterior a la exposición durante el periodo embrionario y en condiciones controladas.

3.2.3.2.1. Primer Experimental B (EB1)

En este experimental exploratorio de las concentraciones efectivas de ENDO y CIP en *S. merianae* se utilizaron huevos provenientes de tres nidos distintos de la temporada reproductiva 2014. En total se usaron 132 huevos que se distribuyeron al azar en 11 grupos experimentales (GE, cada uno con su respectiva réplica), distribuidos de igual manera que en los experimentales anteriores (2 huevos/nido/réplica, n/réplica=6, n/GE=12). Se utilizó un CN, un CP, cuatro grupos expuestos a ENDO y cuatro a CIP (Tabla 3.4). Se utilizó etanol como CV en un volumen final de 25 µL por huevo, debido a que este mismo compuesto se utilizó para la dilución de los formulados. En el caso del CP, la concentración de CF utilizada en EB1 y EB2 fue la mitad de la aplicada en el EA2 debido a que la concentración de 200 µg CF/huevo produjo una mortalidad mayor a la esperada.

Tabla 3.4. Grupos y concentraciones aplicadas en el primer experimental de exposición *in ovo* a CIP y ENDO (EB1).

Grupo experimental	Concentración	N/réplica	N / grupo experimental
Control Negativo (CN)	25 µl H ₂ O destilada (vol.)/huevo	6	12
Control Positivo (CP)	100 µg CF/huevo	6	12
Control Vehículo (CV)	25 µl Etanol/ huevo	6	12
CIP 1	1 µg CIP/huevo	6	12
CIP 10	10 µg CIP/huevo	6	12
CIP 100	100 µg CIP/huevo	6	12
CIP 1000	1000 µg CIP/huevo	6	12
ENDO 1	1 µg ENDO/huevo	6	12
ENDO 10	10 µg ENDO/huevo	6	12
ENDO 100	100 µg ENDO/huevo	6	12
ENDO 1000	1000 µg ENDO/huevo	6	12

EB1: primer experimental B; **CP:** control positivo; **CN:** control negativo; **CV:** control vehículo; **CIP:** distintas concentraciones de formulación de cipermetrina; **ENDO:** distintas concentraciones de formulación de endosulfán; **CF:** ciclofosfamida; **Vol.:** volumen aplicado; **µg:** microgramos; **N:** número.

Las condiciones experimentales fueron las mismas que se aplicaron para RU y descritas en el apartado 3.2.1. de este Capítulo. En la selección de las concentraciones de las formulaciones de ENDO y CIP se tomaron en cuenta datos de referencia aplicados para otras especies mencionados en la Tabla 3.1 en el apartado 3.2.2.3.

3.2.3.2.2. Segundo Experimental B (EB2)

Este experimental corresponde a la repetición del EB1 para corroborar los datos obtenidos, respetando las mismas condiciones experimentales e incluyendo otro GE, expuesto a la mezcla de los tres agroquímicos evaluados previamente en forma individual. Para ello se utilizaron 72 huevos de 3 nidos (24 huevos de cada nido) distribuidos equitativamente en los 12 GE, sin réplica por la ausencia de nidos con gran número de huevos. De esta manera, cada GE contenía 6 huevos en total (2 huevos por nido, Tabla 3.5). Esta repetición se realizó en la temporada reproductiva 2015.

Tabla 3.5. Grupos y concentraciones aplicadas en el segundo experimental de exposición *in ovo* a CIP, ENDO y mezcla de formulaciones evaluadas (EB2).

Grupo experimental	Concentración	N/grupo experimental
Control Negativo (CN)	25 µl H ₂ O destilada (vol.)/huevo	6
Control Positivo (CP)	100 µg CF/huevo	6
Control Vehículo (CV)	25 µl etanol/huevo	6
CIP 1	1 µg CIP /huevo	6
CIP 10	10 µg CIP /huevo	6
CIP 100	100 µg CIP /huevo	6
CIP 1000	1000 µg CIP /huevo	6
ENDO 1	1 µg ENDO/ huevo	6
ENDO 10	10 µg ENDO/huevo	6
ENDO 100	100 µg ENDO/huevo	6
ENDO 1000	1000 µg ENDO/huevo	6
Mezcla	10 µg ENDO/huevo +10 µg CIP/huevo +100 µg RU /huevo	6

EB2: segundo experimental B; **CP:** control positivo; **CN:** control negativo; **CV:** control vehículo; **CIP:** distintas concentraciones de formulación de cipermetrina; **ENDO:** distintas concentraciones de formulación de endosulfán; **RU:** concentración de formulación comercial Roundup; **CF:** ciclofosfamida; **Vol.:** volumen aplicado; **µg:** microgramos; **N:** número.

3.2.4. VARIABLES REGISTRADAS EN NEONATOS

3.2.4.1. Éxito de eclosión y malformaciones externas

Se registró el éxito de eclosión en todos los grupos experimentales de EA y EB. Seguidamente a la eclosión, todos los neonatos de cada GE fueron examinados para detectar la presencia de malformaciones externas.

3.2.4.2. Genotoxicidad

3.2.4.2.1. Muestras de sangre periférica de neonatos

Dentro de las 24 horas post-eclosión, se obtuvieron muestras de sangre de todos los neonatos del EA y EB, como fue descrito en 2.6, y se aplicaron el Ensayo de MN y EC. Además, se incorporó el Ensayo de Anormalidades Nucleares debido a que durante el análisis de los extendidos para el Ensayo de MN con muestras del EA, se observaron numerosas variaciones en la morfología de los núcleos eritrocíticos de la iguana overa. Esto se denominó como ensayo de MN con enfoque citoma (MN-citoma; Aiassa *et al.*, 2014).

3.2.4.2.2. Ensayo Cometa

Se aplicó EC en cada muestra de sangre periférica de todos los neonatos teniendo en cuenta los ajustes metodológicos obtenidos en el Capítulo 2 (apartado 2.3.1).

3.2.4.2.3. Ensayo de MN

Se aplicó el Ensayo de MN en las muestras de todos los neonatos de acuerdo a los ajustes metodológicos realizados en el Capítulo II (apartado 2.3.2).

3.2.4.2.4. Ensayo de Anormalidades Nucleares (AN)

El Ensayo de AN fue aplicado de acuerdo con lo descrito por Carrasco *et al.* (1990). Se registraron como AN las siguientes figuras: *brote nuclear* (BN), *núcleo con muesca* (NM), *núcleo excéntrico* (NE), *núcleo irregular* (NI) y *eritrocito anucleado* (EritA; Fig. 3.4). Los resultados de cada AN fueron expresados como la frecuencia de dicha figura sobre un total de 1000 eritrocitos contabilizados por muestra analizada (dos réplicas). Además, se consideró una última categoría denominada *AN totales* (ANT) como la sumatoria de todas las figuras identificadas por muestra.

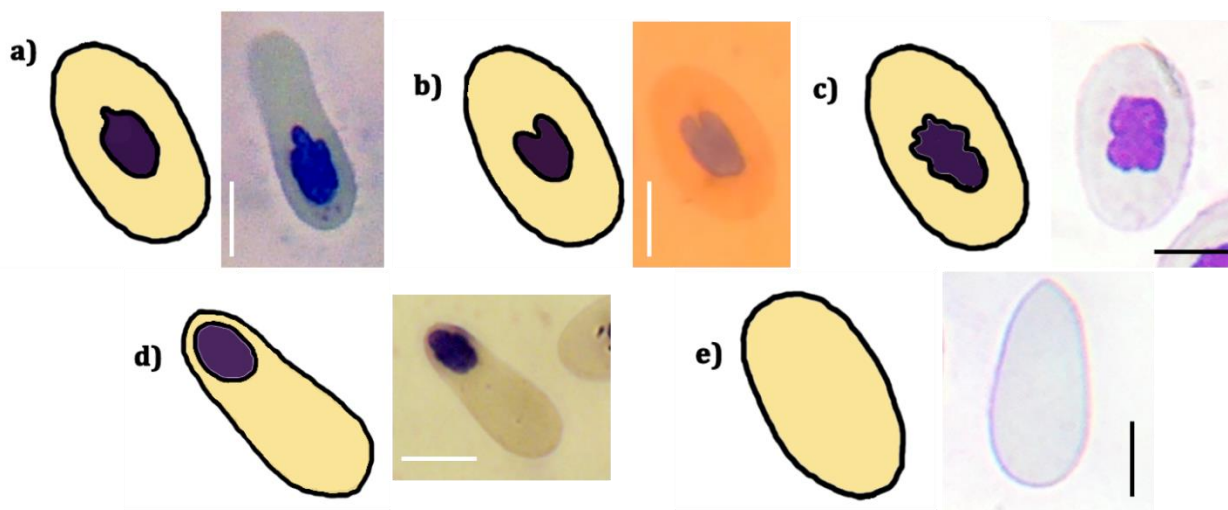


Figura 3.4. Esquema y foto de categorías de Anormalidades Nucleares analizadas en eritrocitos de la iguana overa. a) Brote Nuclear, barra= 12 μm ; b) Núcleo con Muesca, barra= 10 μm ; c) Núcleo Irregular, barra= 10 μm ; d) Núcleo Excéntrico, barra= 12 μm ; e) Eritrocito Anucleado, barra= 10 μm .

3.2.4.3. Seguimiento postnatal

Inmediatamente luego de la eclosión, los neonatos fueron medidos con una cinta métrica (0,1 cm de precisión) y pesados con balanza eléctrica Electronic Compact Scale, TH 200 (0,1 g de precisión).

Durante el primer año de vida, todos los animales fueron mantenidos en condiciones controladas sin exposición adicional, como fue descrito en el apartado 2.2.1.2. En este periodo, se realizaron seguimientos del peso y de la longitud de los animales con mediciones trimestrales para registrar el crecimiento post exposición. Para llevar a cabo este seguimiento se requirió de la correcta individualización de los animales.

3.2.4.3.1. Individualización de los neonatos

Entre las metodologías de identificación individual disponibles para reptiles (Manzanilla y Péfaur, 2000; McDiarmi *et al.*, 2012), el registro fotográfico y el corte de uña-falange están considerados como los procedimientos más confiables para su utilización en la iguana overa. En los experimentales se aplicaron las dos metodologías en forma paralela con el fin de asegurar la identificación de los individuos sin confusiones, aunque hay que destacar que la segunda metodología fue la que mejor se

ajustaba a la dinámica de trabajo a la hora de localizar los individuos de una manera rápida y ágil, permitiendo un seguimiento de los animales en el tiempo.

3.2.4.3.1.1. Registro fotográfico

Los neonatos fueron individualizados mediante un registro fotográfico de la parte ventral del cuerpo dado que cada ejemplar tiene un patrón de manchas único, permanente e irrepetible (Fig. 3.5). Se utilizó una cámara digital Sony CyberShot DSC-H20 con 10X óptico.



Figura 3.5. Patrón de manchas único e irrepetible en la parte ventral del cuerpo de una iguana overa. Barra= 1 cm.

3.2.4.3.1.2. Cortes de uñas-falange

Este método consiste en el corte de uñas y la primera falange teniendo en cuenta una combinación de dedos de las patas delanteras y traseras. La numeración de los dedos se estableció de derecha a izquierda, comenzando con los dedos n° 1 al 5 de la pata derecha delantera (PDD), continuando con los dedos n° 6 al 10 de la pata izquierda delantera (PID), para seguir con los dedos n° 11 al 15 de la pata derecha trasera (PDT) y finalizar con los dedos n° 16 al 20 de la pata izquierda trasera (PIT). Por ejemplo, se combinaron los dedos 1 PDD y 6 PID, 1 PDD y 7 PID... 2 PDD y 6 PID, así sucesivamente hasta terminar el número de individuos para marcar. De esta manera, se individualizaron las crías de cada experimental con una combinación diferente y continua para evitar confusiones.

3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados de los **EA** (RU) y **EB** (CIP y ENDO) se realizó mediante el programa estadístico SPSS 17.0 para Windows. Las diferencias entre réplicas de cada GE se analizaron mediante Test t. Se aplicó la prueba de Rachas (Conover, 1998; Montgomery, 2004) para determinar la independencia de los datos en cada GE, tomando como valor de corte la media muestral. Todas las variables fueron testeadas en normalidad y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente. El CP1 del **EA1** fue desestimado de los análisis estadísticos realizados para todas las variables debido a que el 90% de los huevos en ese GE resultaron inviables luego de la exposición a la mayor concentración de CF testada y, en consecuencia, nació un único individuo.

Las variables del **EA1** (peso y LHC al nacer, ID, NE, NI, EA y ANT) y del **EA2** (peso y LHC al nacer, ID, FMN, BN, NM, NI, NE y ANT) que cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad fueron evaluados mediante ANOVA seguido del test de Dunnet para comparar los grupos expuestos a RU contra el CN. En tanto que aquellas que no cumplieron con los supuestos (**EA1**: éxito de eclosión, FMN, BN y NM; **EA2**: éxito de eclosión, EritA) fueron analizadas mediante el test de Kruskal Wallis seguido del test de Mann-Whitney para su comparación contra el CN.

Las variables del **EB1** (LHC al nacer, ID, NM, NI, NE, EA y ANT) y **EB2** (LHC al nacer, BN, NM, NI, EA y ANT) que cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad fueron analizados mediante ANOVA seguido del test de Dunnet para comparar los grupos expuestos a los plaguicidas contra el CV. El resto de los parámetros que no cumplieron con los supuestos (**EB1**: éxito de eclosión, peso al nacer, FMN y BN y **EB2**: éxito de eclosión, peso al nacer, ID, FMN y EA) se analizaron con los test no paramétricos Kruskal Wallis y Mann-Whitney.

Se evaluó si hubo influencia del nido de origen sobre las medidas de LHC y peso, y los valores de genotoxicidad para todos los datos obtenidos del **EA** y **EB**, mediante un ANOVA-Tukey o Kruskal-Wallis, dependiendo de la distribución de la variable analizada. Por otra parte, se analizó si existía una relación entre las variables morfométricas y de genotoxicidad así como también entre la

exposición a las diferentes formulaciones testeadas y la mortandad embrionaria o postnatal obtenida en todos los experimentales de **EA** y **EB** mediante regresiones lineales simples (RLS).

El análisis de los valores trimestrales del peso y la LHC desde la eclosión hasta los 12 meses de vida de las iguanas en los **EA2**, **EB1** y **EB2** se realizaron con los datos de los animales que sobrevivieron en este periodo y se descartaron de los análisis aquellos en los que no se completaron todas las mediciones. Los datos fueron analizados mediante el Modelo Lineal General con Medidas Repetidas, utilizando ajustes de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los grupos RU200 y RU800 del **EA2** contaban con un solo individuo a partir de los 3 meses y el CP del **EB1** a partir de 9 meses por lo que se desestimaron del análisis de medidas repetidas. En el caso del **EA1**, el análisis del crecimiento por medidas repetidas no fue posible debido a que varios animales de todos los grupos experimentales murieron en el transcurso del primer año de vida, principalmente luego de los 6 meses de vida. Las muertes registradas fueron consideradas independientes de los tratamientos de exposición debido a que en los diferentes grupos se producían peleas entre los individuos por el espacio, el alimento o algún otro factor que no fuera contemplado. Además, ocurrieron inconvenientes técnicos en el registro del peso y LHC a los 3 meses post-exposición, por lo que no se pudo realizar el registro. En consecuencia, se consideró el crecimiento de los animales del **EA1** a los 6 meses de vida como la diferencia de peso (g) y LHC (cm) entre los 6 meses y el momento de la eclosión. El incremento se analizó mediante el test de Kruskal Wallis. Otra importante aclaración es que el RU200 (**EA1**) fue desestimado de este mismo análisis puesto que solo sobrevivió un individuo hasta ese periodo por diferentes causas que no se pudieron determinar.

Todos los valores obtenidos se expresaron como la media \pm desvío estándar ($X \pm DE$), y se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. EXPERIMENTAL A: EXPOSICIÓN *IN OVO* AL FORMULADO DE GLIFOSATO

3.3.1.1. Primer Experimental A:

En este primer experimental de exposición no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las réplicas de los GE para ninguna de las variables analizadas ($p > 0,05$; *Test t*), por lo que los resultados se informan por GE. Desde los primeros días del inicio del experimental hasta la mitad del periodo de incubación se descartaron, en total, 61 huevos inviables entre todos los GE (CN: 6 h; CP1: 11 h; CP2: 9 h; RU50: 4 h; RU100: 7 h; RU200: 7h; RU400: 4 h; RU800: 7 h; RU1600: 6 h), para evitar la presencia posterior de hongos y bacterias que pudieran afectar al resto de los huevos. La mayor cantidad de muertes embrionarias se produjo en CP con la mayor concentración de CF testada (400 μg ciclofosfamida/huevo). El éxito de eclosión de los neonatos en este primer experimental fue del 43,52% que coincide con el éxito de eclosión obtenido en los nidos incubados por el Proyecto Iguanas para la misma temporada reproductiva. El éxito de eclosión no mostró diferencias significativas entre los GE ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis*). No se registraron malformaciones en ningún neonato de los GE o los controles. La prueba de Rachas indicó la independencia de los datos para todas las variables de genotoxicidad ($p > 0,063$; Test de Rachas) así como morfométricas ($p > 0,210$; Test de Rachas). El ensayo de viabilidad celular demostró, en todas las muestras, una viabilidad del 90–100%. Los valores de ID mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos a RU200, RU400, RU800, RU1600, CP200 y el CN ($p < 0,05$, ANOVA-Dunnett; Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Índice de daño al ADN (media \pm DE) en neonatos de *S. merianae* del Experimental A1, según el grupo experimental

Grupo Experimental	n	Índice de Daño
CN	6	120,17 \pm 20,33
CP200	3	205,67 \pm 23,63*
RU50	8	140,88 \pm 39,34
RU100	5	170,60 \pm 45,72
RU200	5	262,20 \pm 39,99*
RU400	8	209,25 \pm 48,35*
RU800	5	264,40 \pm 36,81*
RU1600	6	253,83 \pm 68,72*

CN: control negativo; CP: control positivo con 200 μ g/huevo de ciclofosfamida; RU: distintas concentraciones de la formulación comercial de Roundup. *Indica diferencia estadísticamente significativa respecto del CN ($p < 0,05$; ANOVA-Dunnett).

Sin embargo, el incremento de los valores de ID en las concentraciones crecientes de RU no mostró una relación concentración-efecto ($R^2 = 0,075$, $p > 0,05$; Tabla 3.6). En tanto que el análisis de regresión con los valores de las medias de ID mostró un mejor ajuste de los valores, indicando una relación débil ($R^2 = 0,532$, $p < 0,05$; Tabla 3.6). En el caso de la FMN al igual que las frecuencias de BN y NM no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos a RU o CP y el CN ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis*). Las frecuencias de NE, NI, EritA y ANT tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los GE ($p > 0,05$; ANOVA-Dunnett; Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Frecuencia de MN y AN (media \pm DE) en neonatos de *S. merianae* del Experimental A1, según el grupo experimental

GE	n	FMN	Anormalidades Nucleares					
			BN	NM	NI	NE	EritA	ANT
CN	6	0,83 \pm 0,75	4,50 \pm 3,27	7,50 \pm 5,68	39,50 \pm 30,18	1,17 \pm 1,17	0,50 \pm 0,55	53,17 \pm 31,68
CP200	3	2,67 \pm 1,15	6,00 \pm 1,73	19,67 \pm 3,50	74,67 \pm 40,10	3,00 \pm 2,64	1,67 \pm 0,33	105,00 \pm 42,00
RU50	8	1,25 \pm 1,03	5,50 \pm 3,38	7,38 \pm 2,81	49,50 \pm 43,62	1,75 \pm 1,67	0,50 \pm 0,92	64,62 \pm 45,10
RU100	5	1,20 \pm 0,84	4,20 \pm 1,92	10,40 \pm 5,73	73,40 \pm 45,86	1,20 \pm 1,30	1,00 \pm 1,22	90,20 \pm 43,25
RU200	5	2,20 \pm 1,30	5,60 \pm 4,56	5,60 \pm 2,60	57,80 \pm 49,96	1,60 \pm 1,52	1,20 \pm 1,30	71,80 \pm 47,88
RU400	8	1,75 \pm 1,91	17,88 \pm 21,49	16,25 \pm 15,14	49,00 \pm 46,87	4,50 \pm 2,56	0,75 \pm 0,88	88,37 \pm 52,39
RU800	5	3,20 \pm 4,09	5,80 \pm 2,86	7,20 \pm 4,04	31,00 \pm 21,94	2,20 \pm 4,38	0,60 \pm 1,34	46,80 \pm 23,03
RU1600	6	1,67 \pm 1,97	10,33 \pm 7,94	10,67 \pm 5,73	56,83 \pm 58,66	3,17 \pm 2,31	0,33 \pm 0,51	81,33 \pm 64,35

GE: grupos experimentales; CN: control negativo; CP: control positivo; RU: distintas concentraciones de la formulación comercial de Roundup; FMN: frecuencia de micronúcleos; BN: brote nuclear; NM: núcleo con muesca; NE: núcleo excéntrico; NI: núcleo irregular; EritA: eritrocito anucleado; ANT: anomalías nucleares totales.

Al analizar la influencia del nido de origen sobre los valores de MN o ID, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso ($p > 0,05$; ANOVA). Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los nidos utilizados en algunas Anormalidades Nucleares como NI (Nido 2 vs Nido 1 y 3= $p < 0,01$), EritA (Nido 2 vs Nido 1= $p < 0,05$) y en ANT (Nido 2 vs Nido 1 y 3= $p < 0,01$), al igual que para LHC y peso (Nido 3 vs Nido 1 y 2= $p < 0,01$) (ANOVA-Tukey). No se encontró una relación lineal entre los valores de FMN o del ID con la LHC o peso de los neonatos al eclosionar ($p > 0,05$; RLS).

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso y en la LHC de los neonatos al eclosionar entre los grupos expuestos a RU o CP y el CN ($p > 0,05$, ANOVA-Dunnett,) ni en la comparación de todos los GE entre sí ($p > 0,05$, ANOVA-Tukey; Tabla 3.8). En el seguimiento de los animales se registró una mortalidad que afectó a 22 individuos desde la primera medición post-eclosión hasta los 6 meses de vida, pertenecientes a distintos grupos experimentales incluido el CN, no habiendo diferencia entre ellos ($p > 0,05$, test Mann Whitney). No se encontró relación entre la exposición y la mortandad embrionaria o postnatal ($p = 0,765$, $R^2 = 0,020$ y $p = 0,456$, $R^2 = 0,115$; respectivamente; RLS), razón por la cual no se consideró como un efecto letal del herbicida estudiado. A los 6 meses de vida, el peso y la LHC de las iguanas aumentaron en todos los GE y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0,05$, test de Kruskal Wallis; Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Peso y LHC (media \pm DE) al eclosionar y su incremento a los 6 meses de vida de ejemplares de *S. merianae* post-exposición *in ovo* en el Experimental A1, según el grupo experimental

GE	Al eclosionar			Incremento a los 6M		
	n	LHC (cm)	Peso (g)	n	LHC (cm)	Peso (g)
CN	6	8,35 \pm 0,45	15,63 \pm 2,15	3	4,10 \pm 0,36	37,70 \pm 9,07
CP200	3	8,13 \pm 0,11	14,13 \pm 0,29	2	5,05 \pm 3,46	62,70 \pm 63,21
RU50	8	7,91 \pm 0,44	13,20 \pm 2,42	5	3,88 \pm 1,06	28,88 \pm 10,97
RU100	5	8,08 \pm 0,34	14,52 \pm 0,51	5	5,28 \pm 2,35	66,20 \pm 41,71
RU200	5	8,02 \pm 0,48	14,86 \pm 3,13	1	3,00 \pm 0,00	22,40 \pm 0,00
RU400	8	7,71 \pm 0,56	12,38 \pm 2,66	3	4,97 \pm 2,96	56,23 \pm 47,87
RU800	5	8,16 \pm 0,52	15,12 \pm 2,09	2	6,60 \pm 0,28	90,15 \pm 49,43
RU1600	6	7,85 \pm 0,28	14,02 \pm 1,68	2	3,65 \pm 1,91	30,65 \pm 27,35

GE: grupos experimentales; n: número de individuos en cada GE; CN: control negativo; CP: control positivo con 200 μ g/huevo de ciclofosfamida; RU: distintas concentraciones de la formulación comercial de Roundup; LHC: longitud hocico cloaca; g: gramos; 6M: 6 meses de vida.

3.3.1.2. Segundo Experimental A:

En esta repetición del ensayo de exposición a RU, se descartó de la incubación un total de 49 huevos inviables (CN: 7 h; CP200: 9 h; RU200: 9 h; RU400: 8 h; RU800: 8 h; RU1600: 8 h). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las réplicas de los GE para ninguna de las variables analizadas ($p > 0,05$; *Test t*). El éxito de eclosión fue del 35 % y no hubo diferencias significativas entre los GE ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis*). No se registraron malformaciones en ninguna cría de los grupos expuestos *in ovo* a RU ni en el control utilizado. La prueba de Rachas indicó la independencia de los datos para todas las variables de genotoxicidad ($p > 0,171$) a excepción de los Núcleos con muesca del RU800 para el que no se pudo realizar porque sólo se encontró una racha. En el caso de las variables morfométricas, la independencia se comprobó para todas las variables ($p > 0,215$).

Los valores de genotoxicidad medidos por el Ensayo Cometa indicaron un incremento estadísticamente significativo en el nivel de daño al ADN en los grupos RU200, RU400, RU800 y RU1600 respecto del CN ($p < 0,05$; ANOVA-*Dunnett*; Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Índice de daño al ADN (media \pm DE) en neonatos de *S. merianae* del Experimental A2, según el grupo experimental

Grupo Experimental	n	Índice de Daño
CN	5	108,50 \pm 5,75
CP200	3	112,75 \pm 5,38
RU200	3	153,50 \pm 41,72*
RU400	5	136,40 \pm 14,75*
RU800	3	224,00 \pm 25,45*
RU1600	4	149,00 \pm 16,39*

CN: control negativo; CP: control positivo con 200 μ g/huevo de ciclofosfamida; RU: distintas concentraciones de la formulación comercial de Roundup.

*Indica diferencia estadísticamente significativa respecto del CN ($p < 0,05$; ANOVA-*Dunnett*)

Entre las distintas ANs, sólo se observó un incremento estadísticamente significativo en los NI para RU200 y RU800 respecto del CN ($p=0,040$ y $p= 0,001$, respectivamente; ANOVA-*Dunnett*), y en las ANT entre RU800 y el CN ($p= 0,013$; ANOVA-*Dunnett*; Tabla 3.8). Por el contrario, en la FMN y las figuras BN, NM y NE no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los GE y el

CN ($p > 0,05$; *test de Dunnett, ANOVA*). Esto mismo ocurrió en el caso de la figura EritA ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis*; Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Frecuencia de MN y AN (media \pm DE) en neonatos de *S. merianae* del Experimental A2, según el grupo experimental

GE	n	FMN	Anormalidades Nucleares					
			BN	NM	NI	NE	EritA	ANT
CN	5	2,17 \pm 1,17	5,17 \pm 2,39	10,00 \pm 8,18	18,33 \pm 10,25	5,00 \pm 4,29	0,83 \pm 1,33	39,33 \pm 30,06
CP200	3	1,75 \pm 1,26	4,00 \pm 3,43	6,50 \pm 3,50	29,50 \pm 20,42	6,00 \pm 5,83	0,75 \pm 0,95	46,75 \pm 11,30
RU200	3	3,00 \pm 1,41	7,00 \pm 2,83	12,50 \pm 0,71	57,00 \pm 12,73*	5,50 \pm 3,54	4,00 \pm 4,24	86,00 \pm 7,07
RU400	5	4,00 \pm 2,55	5,60 \pm 3,29	14,00 \pm 9,27	33,20 \pm 21,80	7,40 \pm 3,51	1,80 \pm 2,05	62,00 \pm 31,23
RU800	3	4,00 \pm 0,00	10,50 \pm 6,36	16,00 \pm 0,00	83,00 \pm 24,04*	6,50 \pm 2,12	1,50 \pm 2,12	117,50 \pm 21,92*
RU1600	4	4,50 \pm 1,29	6,25 \pm 3,50	20,25 \pm 14,24	17,50 \pm 9,00	9,50 \pm 3,70	3,50 \pm 1,73	57,00 \pm 24,62

GE: grupos experimentales; CN: control negativo; CP: control positivo con 200 μ g/huevo de ciclofosfamida; RU: distintas concentraciones de la formulación comercial de Roundup; FMN: frecuencia de micronúcleo; BN: brote nuclear; NM: núcleo con muesca; NI: núcleo irregular; NE: núcleo excéntrico; EritA: eritrocito anucleado; ANT: anomalías nucleares totales. *Diferencia estadísticamente significativas respecto del CN ($p < 0,05$; ANOVA-Dunnett).

Al igual que en el EA1, se observó una mortalidad menor al 10% durante el periodo analizado (12 meses) que sólo afectó algunos grupos experimentales. Los valores trimestrales del peso y talla de los neonatos de *S. merianae* de este experimental que sobrevivieron se resumen en las Tablas 3.11 y 3.12, respectivamente.

Tabla 3.11. Peso trimestral (media \pm DE) de ejemplares de *S. merianae* post-exposición *in ovo* en el Experimental A2, según el grupo experimental

GE	n	Peso (g)									
		Al eclosionar	n	3 meses	n	6 meses	n	9 meses	n	12 meses	
CN	5	10,55 \pm 0,21	2	41,05 \pm 0,64	2	39,65 \pm 0,21	2	124,05 \pm 31,47	2	331,50 \pm 108,19	
CP200	3	15,45 \pm 1,91	2	18,50 \pm 1,13	2	32,40 \pm 9,33	2	51,00 \pm 1,41	2	70,95 \pm 5,73	
RU200	3	10,45 \pm 0,35	1	41,60 \pm 0,00	1	37,90 \pm 0,00	1	109,70 \pm 0,00	1	345,00 \pm 0,00	
RU400	5	13,88 \pm 1,99	5	16,60 \pm 2,98	5	26,86 \pm 7,77	5	114,10 \pm 10,28	5	296,40 \pm 29,06	
RU800	3	9,85 \pm 0,21	1	33,00 \pm 0,00	1	37,70 \pm 0,00	1	92,20 \pm 0,00	1	288,00 \pm 0,00	
RU1600	4	14,72 \pm 1,99	4	20,47 \pm 2,60	4	23,52 \pm 3,75	4	81,95 \pm 9,77	4	305,82 \pm 40,42	

GE: grupos experimentales; n: número de individuos en cada GE; CN: control negativo; CP: control positivo con 200 μ g/huevo de ciclofosfamida; RU: distintas concentraciones de la formulación comercial de Roundup; g: gramos.

Tabla 3.12. LHC trimestral (media \pm DE) de los neonatos de *S. merianae* post-exposición *in ovo* en el Experimental A2, según el grupo experimental

GE	LHC (cm)									
	n	Al eclosionar	n	3 meses	n	6 meses	n	9 meses	n	12 meses
CN	5	7,65 \pm 0,07	2	10,90 \pm 0,28	2	11,35 \pm 0,07	2	14,80 \pm 2,12	2	20,25 \pm 1,77
CP200	3	8,37 \pm 0,36	2	9,47 \pm 0,39	2	10,90 \pm 0,56	2	13,10 \pm 0,56	2	14,02 \pm 0,60
RU200	3	7,30 \pm 0,38	1	10,70 \pm 0,00	1	11,20 \pm 0,00	1	14,70 \pm 0,00	1	19,90 \pm 0,00
RU400	5	8,20 \pm 0,45	5	9,54 \pm 0,46	5	10,34 \pm 0,57	5	14,12 \pm 1,07	5	19,48 \pm 0,61
RU800	3	7,15 \pm 0,07	1	10,20 \pm 0,00	1	10,80 \pm 0,00	1	14,00 \pm 0,00	1	18,50 \pm 0,00
RU1600	4	8,40 \pm 0,42	4	9,40 \pm 0,36	4	9,97 \pm 0,26	4	13,62 \pm 1,02	4	19,22 \pm 0,48

GE: grupos experimentales; **n:** número de individuos en cada GE; **CN:** control negativo; **CP:** control positivo con 200 μ g/huevo de ciclofosfamida; **RU:** distintas concentraciones de Roundup; **LHC:** longitud hocico cloaca; **g:** gramos; **6M:** 6 meses de vida.

El seguimiento del crecimiento en peso y LHC de los animales de los grupos RU200 y RU800 no se tuvo en cuenta en los análisis de medidas repetidas debido a que solo se contaba con el dato de un único individuo en estos grupos a partir de los 3 meses. En los demás GE expuestos a RU, los animales que subsistieron durante el primer año de vida luego de la exposición, mostraron un menor incremento de la LHC en relación con los animales del CN. Las diferencias estadísticamente significativas se observaron a los 3 meses de vida entre los grupos RU400, RU1600 y el CN ($p < 0,05$; *MLG, Medidas Repetidas*), a los 6 meses, esa diferencia significativa se mantuvo sólo entre RU1600 y CN ($p < 0,05$; *MLG, Medidas Repetidas*). En tanto que, al eclosionar, a los 9 meses y a los 12 meses de edad no hubo diferencias estadísticamente significativas en la longitud de los animales entre los grupos expuestos a RU y el CN ($p > 0,05$, *Medidas Repetidas*). Los animales del CP fueron los únicos que mostraron menor crecimiento en longitud en comparación con los demás grupos expuestos y el CN, siendo estadísticamente significativo con el CN a los 12 meses de edad ($p < 0,05$; *Medidas Repetidas*; Fig. 3.6).

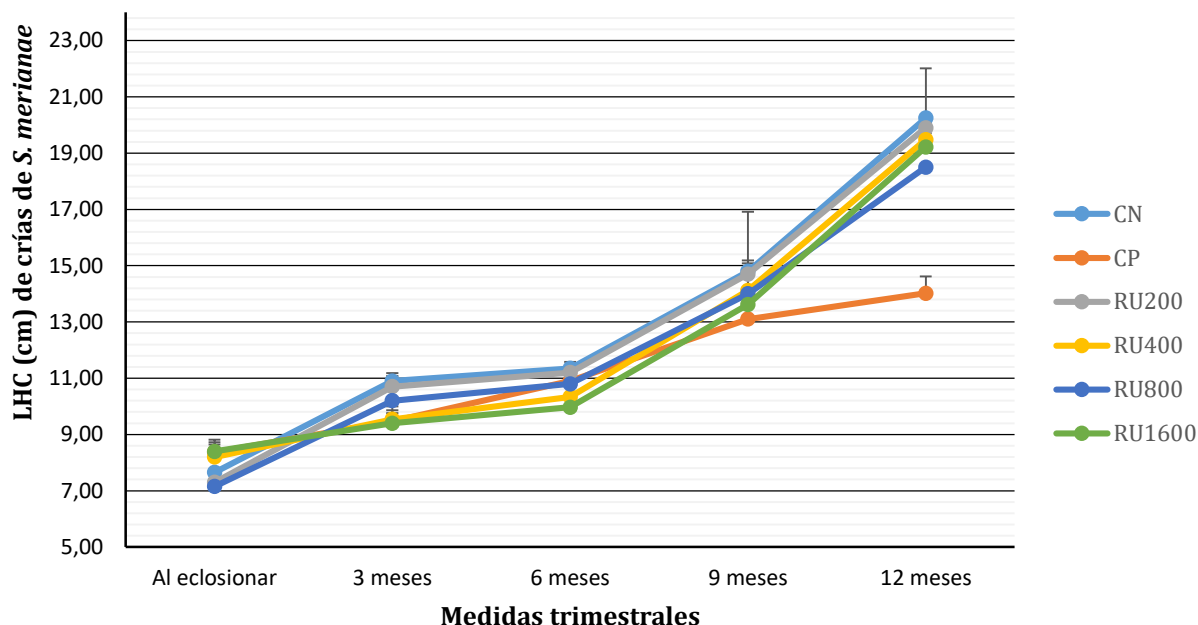


Figura 3.6. Incremento de la LHC (media \pm DE) de los animales de *S. merianae* post-exposición *in ovo* del Experimental A2, durante el primer año de vida. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estandar de la media.

En cuanto al peso durante el primer año de vida, los animales expuestos *in ovo* a RU mantuvieron un menor peso que los ejemplares del CN, con diferencias estadísticamente significativas a los 3 meses entre los grupos RU400, RU1600 y el CN ($p < 0,05$; *Medidas Repetidas*). Los animales del CP mantuvieron un bajo peso en comparación con el de los demás animales de los distintos grupos experimentales, observándose una diferencia estadísticamente significativa con el CN a los 9 y 12 meses de vida ($p < 0,05$). El peso de las iguanas al eclosionar, a los 6 y 12 meses de vida no mostró diferencias significativas entre los grupos expuestos a RU y el CN ($p > 0,05$; Fig. 3.7).

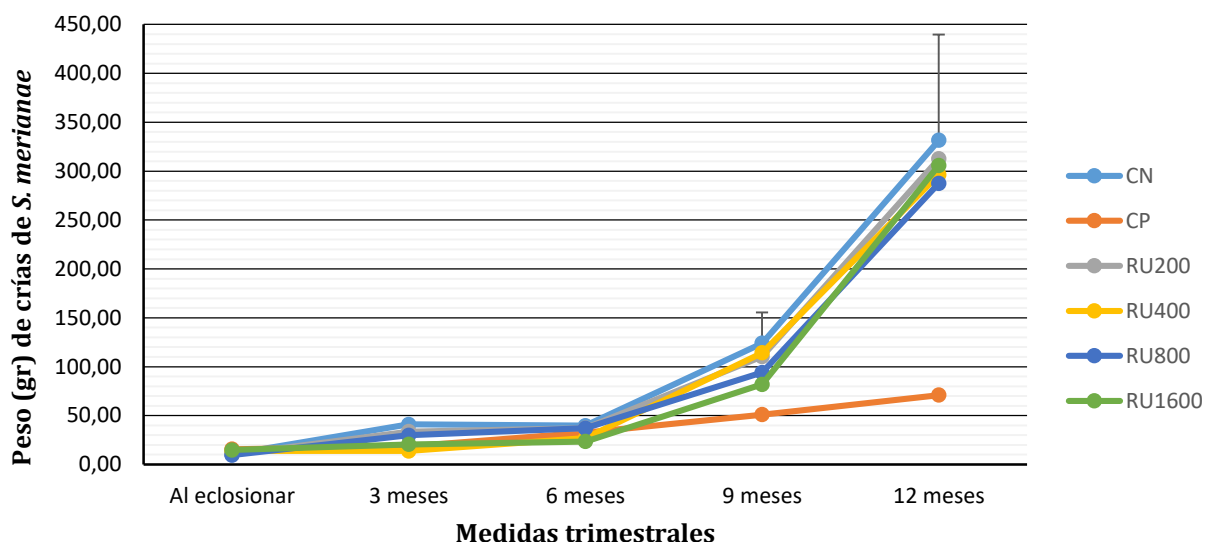


Figura 3.7. Incremento del peso (media \pm DE) de los ejemplares de *S. merianae* post-exposición *in ovo* del Experimental A2, durante el primer año de vida. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estándar de la media.

Se evidenció una fuerte influencia del nido de origen sobre las medidas morfométricas de los ejemplares al eclosionar (Peso y LHC: nido 1 vs nido 2 y 3= $p < 0,01$; ANOVA-*Tukey*), así como también sobre los valores de ANT (Nido 1 vs nido 2= $p < 0,01$) y de NI (Nido 1 vs nido 2 y 3= $p < 0,01$; ANOVA-*Tukey*). No se encontró relación entre la exposición y la mortandad embrionaria ni postnatal ($p=0,858$, $R^2= 0,012$; $p=0,224$, $R^2= 0,437$, respectivamente; *RLS*). Se evidenció una relación negativa estadísticamente significativa muy débil entre los valores de ID, NI, ANT y el peso o la LHC al eclosionar (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Resultados de regresión lineal y logarítmica entre valores de genotoxicidad y el peso o la LHC al eclosionar

n=23	Peso al eclosionar				LHC al eclosionar			
	$p_{lin.}$	$R^2_{lin.}$	$p_{log.}$	$R^2_{log.}$	$p_{lin.}$	$R^2_{lin.}$	$p_{log.}$	$R^2_{log.}$
ID	0,017	0,198	0,043	0,181	0,019	0,234	0,032	0,202
NI	0,010	0,277	0,007	0,301	0,017	0,244	0,016	0,248
ANT	0,005	0,271	0,009	0,282	0,010	0,233	0,235	0,019

LHC: longitud hocico cloaca; **ID:** índice de daño; **NI:** núcleos irregulares; **ANT:** anomalías nucleares totales; **R²:** coeficiente de determinación; **lin.:** regresión lineal; **log.:** regresión logarítmica

3.3.2. EXPERIMENTAL B: EXPOSICIÓN IN OVO AL FORMULADO DE ENDOSULFAN (ENDO; GALGOFAN®), AL DE CIPERMETRINA (CIP; ATANOR®) Y A LA MEZCLA DE ESTOS PLAGUICIDAS

3.3.2.1. Primer Experimental B

Durante el periodo de incubación se descartó un total de 72 huevos inviables entre todos los GE (CN: 7 h; CP: 9 h; CV: 5 h; CIP 1: 9 h; CIP 10: 7 h; CIP 100: 7 h; CIP 1000: 3 h; ENDO 1: 7 h; ENDO 10: 6 h; ENDO 100: 5 h; ENDO 1000: 7 h) y fueron quitados de las bandejas tal como se comentó en el Experimental A. El éxito de eclosión de los neonatos en este experimental fue del 45,45% y no hubo diferencias significativas entre los GE ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis*). Al igual que en la exposición a RU, en este ensayo no se observaron malformaciones en ninguno de los neonatos de los distintos grupos experimentales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las réplicas de los GE para ninguna de las variables analizadas ($p > 0,05$; *Test t*), por lo que los resultados se informan por GE. La prueba de Rachas indicó la independencia de los datos para todas las variables de genotoxicidad ($p > 0,100$), y las morfométricas al nacer ($p > 0,325$) en todos los grupos experimentales, a excepción de la LHC del CP, para la cual no pudo realizarse por generarse una sola racha. El CV y el CN no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de genotoxicidad para los 3 biomarcadores utilizados, indicando que el etanol no causó daño genotóxico ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis* o ANOVA).

Los valores de ID no mostraron aumentos estadísticamente significativos en el CP, ni en las distintas concentraciones de CIP y ENDO comparado con el CV ($p > 0,05$; ANOVA, Figura 3.8). Sin embargo, al compararse con el CN, se observaron diferencias significativas con el CP ($p=0,045$), CIP 1000 ($p=0,008$) y ENDO 100 ($p=0,01$; ANOVA-Dunnett), aun cuando no hubo diferencia entre el CN y CV (Fig. 3.8).

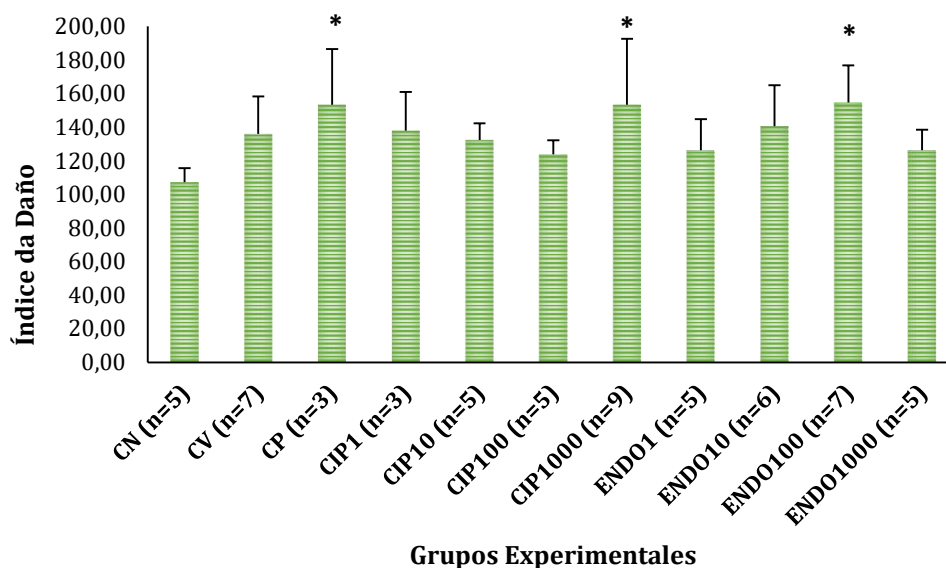


Figura 3.8. Índice de Daño (media ± DE) en neonatos de *S. merianae* post-exposición *in ovo* del Experimental B1. CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100µg/huevo de ciclosfosfamida; CIP: distintas concentraciones de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de endosulfán. *Indica diferencia estadísticamente significativa con el CN ($p < 0,05$; ANOVA-Dunnett).

Por el contrario, la FMN y las distintas ANs no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los GE y los controles ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis* o ANOVA). En la Tabla 3.14 se resumen los resultados de MN y cada AN de acuerdo el GE.

Tabla 3.14. Frecuencia de MN y AN (media ± DE) en neonatos de *S. merianae* del Experimental B1, según el grupo experimental

GE	n	FMN	Anormalidades Nucleares					
			BN	NM	NI	NE	EritA	ANT
CN	5	1,00 ± 0,71	3,80 ± 1,92	6,00 ± 5,05	43,60 ± 23,21	5,60 ± 2,88	2,60 ± 3,21	70,40 ± 27,91
CV	7	2,00 ± 1,91	3,71 ± 3,04	5,86 ± 5,98	60,29 ± 25,91	7,57 ± 6,55	0,86 ± 0,69	88,43 ± 32,87
CP	3	3,67 ± 3,51	4,00 ± 2,64	3,00 ± 2,00	90,00 ± 43,27	4,67 ± 1,15	1,67 ± 2,08	113,00 ± 49,49
CIP1	3	1,67 ± 1,53	4,67 ± 3,51	6,00 ± 5,20	57,67 ± 24,34	5,00 ± 2,64	2,00 ± 2,64	79,33 ± 38,28
CIP10	5	1,00 ± 1,00	3,60 ± 2,61	7,20 ± 5,02	102,40 ± 50,62	3,80 ± 2,59	1,80 ± 1,79	124,60 ± 57,44
CIP100	5	3,40 ± 4,88	3,20 ± 2,17	4,00 ± 2,91	80,40 ± 45,22	6,00 ± 4,24	1,60 ± 2,07	110,60 ± 47,33
CIP1000	9	1,78 ± 1,39	4,11 ± 3,79	7,67 ± 6,08	72,67 ± 50,86	2,89 ± 3,06	2,67 ± 1,73	98,67 ± 62,91
ENDO1	5	1,60 ± 1,52	2,80 ± 2,17	5,00 ± 5,15	48,00 ± 45,69	3,20 ± 1,30	2,60 ± 1,14	69,40 ± 52,48
ENDO10	6	1,50 ± 1,38	4,33 ± 1,63	8,83 ± 3,66	61,67 ± 24,24	4,83 ± 2,14	2,17 ± 1,72	87,67 ± 26,36
ENDO100	7	2,86 ± 2,48	5,43 ± 6,05	6,43 ± 4,54	51,14 ± 13,80	5,43 ± 4,03	1,14 ± 1,34	84,86 ± 33,31
ENDO1000	5	2,20 ± 0,84	3,60 ± 1,67	6,40 ± 4,28	77,40 ± 62,15	4,80 ± 4,44	1,40 ± 1,67	100,20 ± 54,06

DE: desvío estándar; **GE:** grupos experimentales; **CN:** control negativo; **CV:** control de vehículo; **CP:** control positivo; **CIP:** distintas concentraciones de formulación de cipermetrina; **ENDO:** distintas concentraciones de formulación de endosulfán; **FMN:** frecuencia de micronúcleos; **BN:** brote nuclear; **NM:** núcleo con muesca; **NE:** núcleo excéntrico; **NI:** núcleo irregular; **EritA:** eritrocito anucleado; **ANT:** anormalidades nucleares totales.

En el transcurso del año post exposición se registró un total de 13 muertes entre los grupos expuestos, 7 individuos murieron antes de la medición de los 3 meses y 6 individuos murieron antes de la medición de los 9 meses. Las mediciones trimestrales de peso y talla de los ejemplares de *S. merianae* del EB1 se resumen en las Tabla 3.15 y 3.16 (respectivamente), mostrando el número de individuos que se mantuvieron vivos en cada GE durante el año de crianza post-exposición *in ovo* a los plaguicidas.

Tabla 3.15. Peso trimestral (media \pm DE) de ejemplares de *S. merianae* post-exposición *in ovo* en el Experimental B1, según el grupo experimental

GE	Peso (g)									
	n	Al eclosionar	n	3 meses	n	6 meses	n	9 meses	n	12 meses
CN	5	10,48 \pm 0,68	5	24,44 \pm 1,18	5	24,40 \pm 1,17	5	81,52 \pm 18,36	5	198,80 \pm 50,43
CV	7	10,28 \pm 0,67	7	40,15 \pm 3,96	7	51,23 \pm 9,96	7	190,33 \pm 43,84	7	353,27 \pm 78,25
CP	3	11,00 \pm 0,46	3	22,40 \pm 1,75	3	20,73 \pm 0,33	1	42,40 \pm 0,00	1	104,00 \pm 0,00
CIP1	3	10,10 \pm 1,19	3	28,10 \pm 0,96	3	23,97 \pm 1,93	2	87,80 \pm 9,30	2	188,00 \pm 21,00
CIP10	5	10,48 \pm 0,97	4	28,92 \pm 4,63	4	29,85 \pm 3,25	3	95,56 \pm 19,51	3	200,00 \pm 22,59
CIP100	5	9,72 \pm 0,13	4	29,10 \pm 2,83	4	28,55 \pm 2,21	3	93,50 \pm 15,28	3	215,00 \pm 59,91
CIP1000	9	9,63 \pm 0,54	8	26,42 \pm 1,99	8	27,01 \pm 1,64	8	76,87 \pm 9,82	8	180,87 \pm 27,34
ENDO1	5	9,98 \pm 0,68	4	29,37 \pm 4,10	4	29,42 \pm 2,14	4	95,52 \pm 25,88	4	313,25 \pm 70,60
ENDO10	6	10,52 \pm 1,03	6	29,87 \pm 0,69	6	36,25 \pm 5,18	6	80,37 \pm 9,96	6	241,50 \pm 34,41
ENDO100	7	10,40 \pm 0,37	5	29,30 \pm 2,90	5	27,76 \pm 1,99	4	99,25 \pm 31,38	4	231,50 \pm 79,05
ENDO1000	5	9,66 \pm 0,63	4	32,92 \pm 3,48	4	32,92 \pm 3,10	4	118,35 \pm 26,08	4	328,50 \pm 61,20

DE: desvío estándar; n: número de individuos en cada GE; g: gramos; GE: grupos experimentales; CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100 μ g/huevo de ciclofosfamida; CIP: distintas concentraciones de formulación de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de formulación de endosulfán.

Tabla 3.16. LHC trimestral (media \pm DE) de ejemplares de *S. merianae* post-exposición *in ovo* en el EB1, según el grupo experimental

GE	LHC (cm)									
	n	Al eclosionar	n	3 meses	n	6 meses	n	9 meses	n	12 meses
CN	5	7,42 \pm 0,18	5	9,62 \pm 0,18	5	10,12 \pm 0,18	5	13,94 \pm 0,90	5	17,02 \pm 1,36
CV	7	7,30 \pm 0,16	7	10,70 \pm 0,22	7	11,73 \pm 0,58	7	16,58 \pm 1,00	7	21,53 \pm 1,41
CP	3	7,50 \pm 0,10	3	9,50 \pm 0,15	3	9,73 \pm 0,06	1	11,80 \pm 0,00	1	15,00 \pm 0,00
CIP1	3	7,40 \pm 0,42	3	9,83 \pm 0,27	3	9,93 \pm 0,24	2	14,50 \pm 0,50	2	17,90 \pm 0,60
CIP10	5	7,42 \pm 0,31	4	9,95 \pm 0,45	4	10,50 \pm 0,37	3	14,90 \pm 0,91	3	18,13 \pm 0,94
CIP100	5	7,28 \pm 0,11	4	10,02 \pm 0,34	4	10,35 \pm 0,26	3	14,83 \pm 0,75	3	18,07 \pm 1,20
CIP1000	9	7,27 \pm 0,17	8	9,84 \pm 0,24	8	10,31 \pm 0,17	8	14,14 \pm 0,47	8	17,41 \pm 0,76
ENDO1	5	7,26 \pm 0,19	4	10,17 \pm 0,52	4	10,65 \pm 0,25	4	14,30 \pm 1,20	4	19,25 \pm 1,64
ENDO10	6	7,27 \pm 0,23	6	9,90 \pm 0,13	6	10,87 \pm 0,35	6	13,88 \pm 0,50	6	18,25 \pm 0,69
ENDO100	7	7,54 \pm 0,09	5	9,98 \pm 0,20	5	10,42 \pm 0,19	4	14,77 \pm 1,03	4	17,92 \pm 1,37
ENDO1000	5	7,26 \pm 0,28	4	10,42 \pm 0,34	4	10,80 \pm 0,30	4	15,45 \pm 0,97	4	19,75 \pm 0,92

DE: desvío estándar; n: número de individuos en cada GE; LHC: longitud hocico-cloaca; cm: centímetro; GE: grupos experimentales; CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100 μ g/huevo de ciclofosfamida; CIP: distintas concentraciones de formulación de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de formulación de endosulfán.

Los ejemplares de los distintos GE que sobrevivieron en este periodo mostraron incrementos del peso de modo desigual, siendo los del CV los de mayor incremento y los del CP los de menor incremento, comparado con todos los demás GE. Se observaron diferencias significativas entre el CN y CIP1000 con el CV ($p < 0,05$, respectivamente; *MLG, Medidas repetidas*; Fig. 3.9) a los 3 y 6 meses. A los 9 meses, la diferencia significativa fue sólo entre CIP1000 y CV ($p < 0,05$; *MLG, Medidas repetidas*; Fig. 3.9). El resto de los GE no mostró diferencias significativas con el CV al eclosionar ni en las demás mediciones trimestrales ($p > 0,05$; *MLG, Medidas repetidas*; Fig. 3.9).

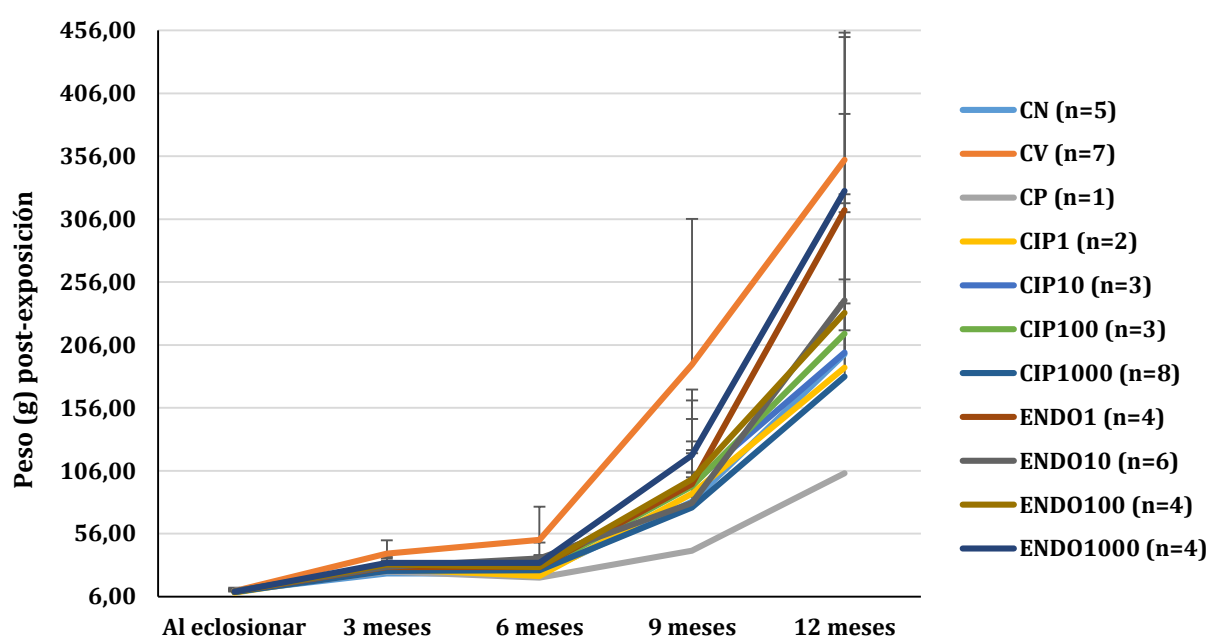


Figura 3.9. Evolución del incremento del peso de los ejemplares de *S. merianae* durante el primer año de vida post-exposición *in ovo* del EB1. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estándar de la media.

La LHC de los animales luego de la exposición *in ovo* no evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes GE y el CN, tanto al eclosionar como en las demás mediciones trimestrales ($p > 0,05$; *MLG, Medidas repetidas*; Fig. 3.10).

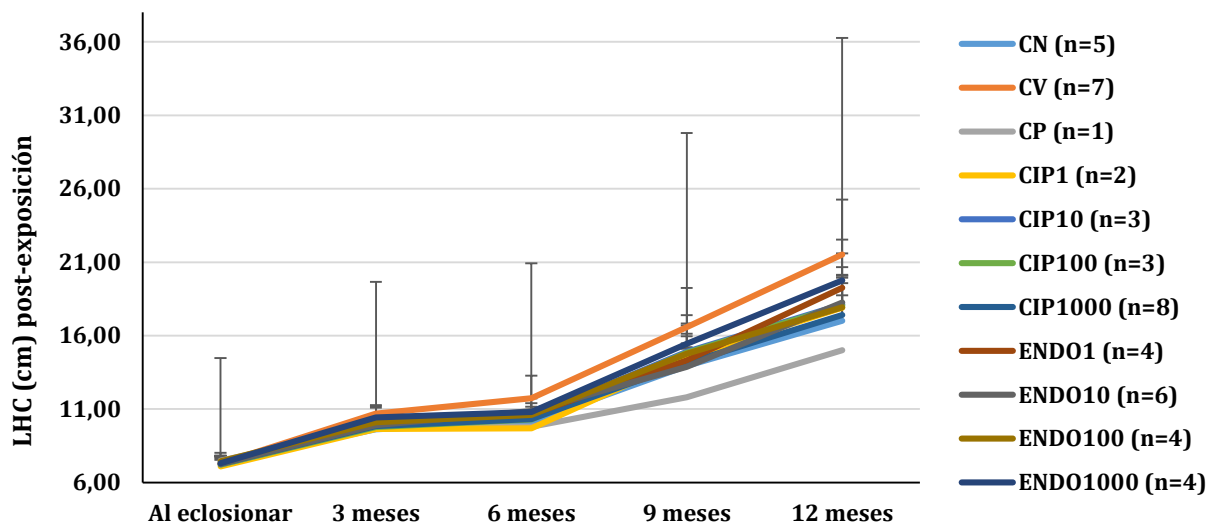


Figura 3.10. Evolución del crecimiento de la LHC en los ejemplares de *S. merianae* durante el primer año de vida post-exposición *in ovo* del EB1. Líneas horizontales: valores medios de cada GE y líneas verticales: desvío estándar de la media.

Se observó un marcado efecto nido en el peso y en la LHC al eclosionar ($p < 0,05$; *ANOVA-Tukey*), así como también en algunas categorías de ANs: BN, NE, NM y NI ($p < 0,05$; *ANOVA-Tukey*). Las demás categorías de ANs, la FMN y el ID no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los nidos utilizados ($p > 0,05$). No se encontró relación entre la mortandad embrionaria o postnatal observada y la exposición a CIP ($p=0,119$, $R^2= 0,609$; $p=0,902$, $R^2= 0,006$) o a ENDO ($p=0,374$, $R^2= 0,266$; $p=0,887$, $R^2= 0,008$, respectivamente; RLS). Tampoco se encontró relación entre los valores de la FMN, las ANs o el ID y la LHC o el peso de los animales al eclosionar ($p > 0,05$; RLS).

3.3.2.2. Segundo Experimental B

Durante el periodo de incubación se descartó un total de 24 huevos inviables entre todos los GE (CN: 2 h; CP: 2 h; CV: 1 h; CIP 1: 2 h; CIP 10: 2 h; CIP 100: 2 h; CIP 1000: 2 h; ENDO 1: 3 h; ENDO 10: 2 h; ENDO 100: 1 h; ENDO 1000: 3 h; mezcla: 2 h). El éxito de eclosión de los neonatos en este experimental fue del 66,67% y no hubo diferencias significativas entre los GE ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis*). Al igual que en la primera exposición *in ovo* a CIP y ENDO, en esta repetición no se observaron malformaciones en ninguno de los neonatos que eclosionaron de los distintos grupos

experimentales. Se demostró la independencia de los datos para todas las variables de genotoxicidad ($p > 0,230$), y las morfométricas ($p > 0,325$) de cada grupo experimental.

El CV y el CN no mostraron diferencias significativas en los valores de genotoxicidad para los biomarcadores aplicados, indicando que el etanol no causó daño genotóxico ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis* o *ANOVA*, Fig. 3.11, 3.12 y Tabla 3.17). Los resultados de genotoxicidad en los ejemplares de *S. merianae* expuestos durante su incubación a CIP, ENDO y a la mezcla de los tres plaguicidas evaluados en este Capítulo evidenciaron una diferencia estadísticamente significativa en el ID de los grupos CP, CIP1000, ENDO100 y mezcla, en comparación con el CV ($p < 0,05$; *Test de Kruskal Wallis-Mann Whitney*; Fig. 3.11).

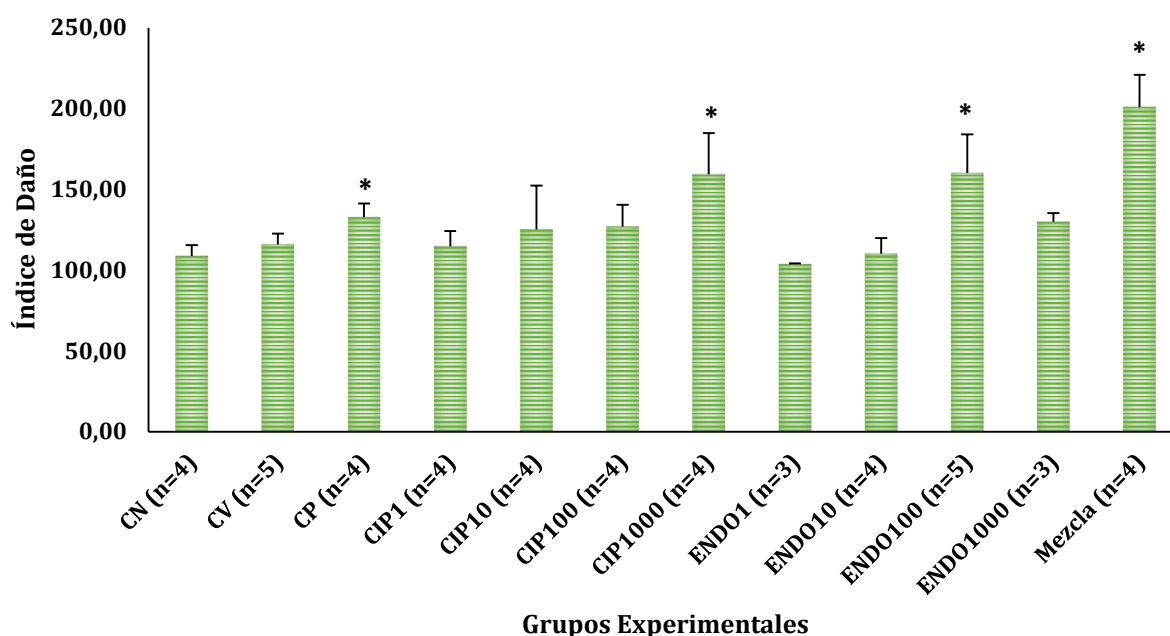


Figura 3.11. Índice de daño (media ± DE) en neonatos de *S. merianae* post-exposición *in ovo* del Experimental B2. CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100µg/huevo de ciclosfosfamida; CIP: distintas concentraciones de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de endosulfán. *Indica diferencia estadísticamente significativa respecto al CV ($p < 0,05$; *Test de Kruskal Wallis-Mann Whitney*).

El ensayo de MN mostró un incremento estadísticamente significativo solamente entre la mezcla y el CV ($p < 0,05$; *Test de Kruskal Wallis-Mann Whitney*; Fig. 3.12). Por el contrario, las frecuencias de

ANs no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes GE y el CV ($p > 0,05$; *test de Kruskal Wallis* o ANOVA, Fig. 3.12).

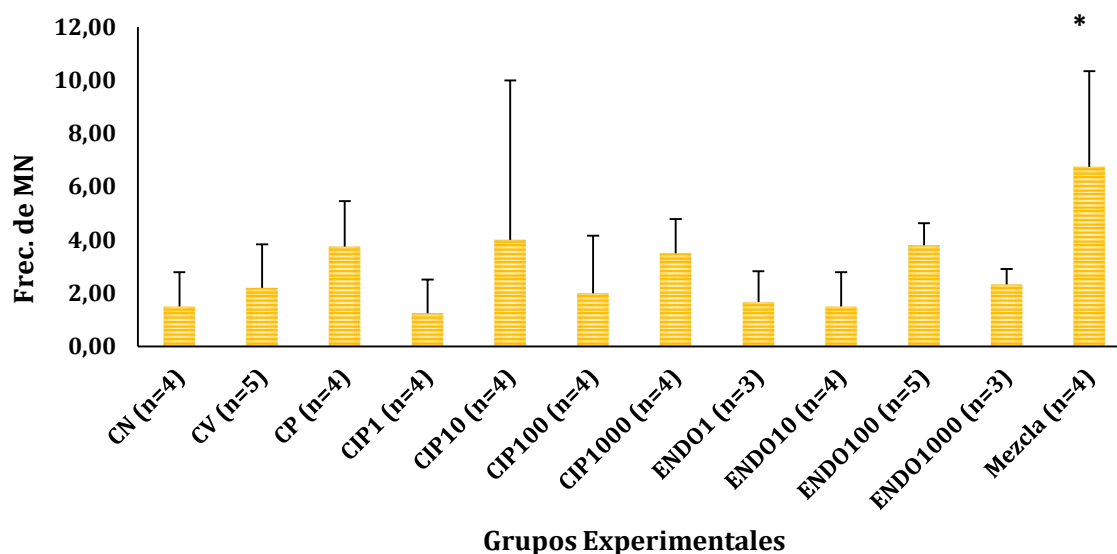


Figura 3.12. Frecuencia de MN (media ± DE) en neonatos de *S. merianae* post exposición *in ovo* del Experimental B2. CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100µg/huevo de ciclosfosfamida; CIP: distintas concentraciones de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de endosulfán. *Indica diferencia estadísticamente significativa respecto al CV ($p < 0,05$; *Test de Kruskal-Mann Whitney*).

Las frecuencias de MN y de las distintas AN se presentan como la media (\pm DE) en la Tabla 3.17, de acuerdo al GE.

Tabla 3.17. Frecuencias de MN y AN (media ± DE) en neonatos de *S. merianae* del Experimental B2, según el grupo experimental

GE	n	FMN	Anormalidades Nucleares					
			BN	NM	NI	NE	EritA	ANT
CN	4	1,50 ± 1,29	4,00 ± 2,94	9,50 ± 7,00	18,00 ± 13,66	5,00 ± 5,29	0,50 ± 1,00	37,00 ± 27,96
CV	5	2,20 ± 1,64	7,80 ± 6,98	11,50 ± 5,37	17,20 ± 17,75	5,00 ± 2,23	2,80 ± 2,28	44,40 ± 26,63
CP	4	3,75 ± 1,71	4,00 ± 2,00	6,50 ± 4,43	29,50 ± 20,42	6,00 ± 5,83	0,75 ± 0,95	46,75 ± 22,60
CIP1	4	1,25 ± 1,26	4,75 ± 4,35	7,25 ± 3,59	7,75 ± 4,03	2,75 ± 2,36	0,75 ± 0,95	23,25 ± 6,95
CIP10	4	4,00 ± 6,00	3,75 ± 2,06	5,50 ± 4,04	9,75 ± 7,50	4,50 ± 3,32	3,25 ± 2,75	26,75 ± 16,74
CIP100	4	2,00 ± 2,16	5,00 ± 4,00	10,50 ± 6,81	19,00 ± 5,71	6,25 ± 3,20	2,75 ± 4,27	43,50 ± 18,19
CIP1000	4	3,50 ± 1,29	8,25 ± 9,25	12,50 ± 4,79	25,00 ± 13,11	5,75 ± 3,40	1,25 ± 1,26	52,75 ± 22,25
ENDO1	3	1,67 ± 1,15	8,33 ± 7,02	13,00 ± 5,57	26,33 ± 24,83	5,67 ± 4,51	2,67 ± 2,08	56,00 ± 18,52
ENDO10	4	1,50 ± 1,29	3,50 ± 2,64	9,00 ± 7,61	15,75 ± 10,90	5,75 ± 6,55	3,25 ± 2,22	37,25 ± 25,82
ENDO100	5	3,80 ± 0,84	5,20 ± 4,09	8,40 ± 7,70	22,80 ± 20,08	4,60 ± 2,89	2,20 ± 3,35	43,20 ± 30,04
ENDO1000	3	2,33 ± 0,58	6,67 ± 5,51	15,33 ± 7,57	36,00 ± 27,49	3,33 ± 1,15	1,00 ± 1,00	62,33 ± 40,81
Mezcla	4	6,75 ± 3,59*	5,25 ± 3,77	15,25 ± 7,93	42,75 ± 22,76	5,00 ± 3,83	0,50 ± 0,58	68,75 ± 27,03

DE: desvío estándar; **GE:** grupos experimentales; **CN:** control negativo; **CV:** control de vehículo; **CP:** control positivo; **CIP:** distintas concentraciones de cipermetrina; **ENDO:** distintas concentraciones de formulación de endosulfán; **FMN:** frecuencia de micronúcleos; **BN:** brote nuclear; **NM:** núcleo con muesca; **NE:** núcleo excéntrico; **NI:** núcleo irregular; **EritA:** eritrocito anucleado; **ANT:** anomalías nucleares totales.

En el transcurso del año post-exposición se produjo un total de 15 muertes entre los grupos expuestos: 3 individuos antes de la medición de los 3 meses, 4 antes de la de los 6 meses, 8 antes de la de los 9 meses de vida. Las mediciones trimestrales de peso y LHC de los ejemplares nacidos en el EB2 y que sobrevivieron al año de vida post-exposición, se resumen en las Tablas 3.18 y 3.19 (respectivamente).

Tabla 3.18. Peso trimestral (media ± DE) de neonatos de *S. merianae* post-exposición *in ovo* en el Experimental B2, según el grupo experimental

GE	Peso (g)									
	n	Al eclosionar	n	3 meses	n	6 meses	n	9 meses	n	12 meses
CN	4	14,78 ± 3,01	4	23,28 ± 3,61	4	26,92 ± 2,36	4	70,27 ± 6,26	4	102,62 ± 14,58
CV	5	15,04 ± 2,65	5	20,26 ± 2,82	5	32,25 ± 9,48	4	50,30 ± 4,49	4	83,70 ± 2,57
CP	4	15,60 ± 1,13	3	20,13 ± 2,94	2	32,40 ± 9,33	2	51,00 ± 1,40	2	70,95 ± 5,73
CIP1	4	16,37 ± 0,98	3	23,27 ± 2,54	3	27,30 ± 2,64	3	47,53 ± 8,20	3	91,60 ± 45,00
CIP10	4	15,32 ± 1,57	4	21,65 ± 3,31	3	24,43 ± 1,84	2	68,65 ± 0,49	2	93,25 ± 16,62
CIP100	4	15,45 ± 1,39	3	23,03 ± 6,31	3	28,60 ± 1,99	3	48,87 ± 10,85	3	88,03 ± 27,97
CIP1000	4	16,37 ± 2,78	4	21,30 ± 0,98	3	31,23 ± 8,01	3	51,00 ± 12,42	3	75,43 ± 18,18
ENDO1	3	13,70 ± 1,00	3	20,37 ± 0,85	3	27,53 ± 8,06	1	91,00 ± 0,00	1	145,00 ± 0,00
ENDO10	4	15,12 ± 1,80	4	22,92 ± 3,02	4	33,92 ± 11,77	3	77,33 ± 35,74	3	108,67 ± 51,72
ENDO100	5	15,14 ± 1,88	5	18,86 ± 4,32	5	30,96 ± 7,41	4	48,10 ± 7,53	4	100,57 ± 6,13
ENDO1000	3	15,87 ± 4,19	3	24,47 ± 6,62	3	30,40 ± 4,66	2	43,35 ± 9,26	2	91,20 ± 7,78
Mezcla	4	16,22 ± 2,02	4	19,20 ± 1,38	3	26,23 ± 4,82	2	46,65 ± 18,17	2	72,60 ± 24,32

DE: desvío estándar; n: número de individuos en cada GE; g: gramos; GE: grupos experimentales; CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100 µg/huevo de ciclofosfamida; CIP: distintas concentraciones de formulación de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de formulación de endosulfán.

Tabla 3.19. LHC trimestral (media ± DE) de neonatos de *S. merianae* post-exposición *in ovo* en el Experimental B2, según el grupo experimental

GE	LHC (cm)									
	n	Al eclosionar	n	3 meses	n	6 meses	n	9 meses	n	12 meses
CN	4	8,35 ± 0,64	4	9,71 ± 0,52	4	10,15 ± 0,19	4	11,80 ± 0,14	4	16,35 ± 0,72
CV	5	8,26 ± 0,49	5	9,42 ± 0,48	5	10,62 ± 0,99	4	13,10 ± 0,79	4	14,02 ± 0,82
CP	4	8,50 ± 0,34	3	9,33 ± 0,23	2	9,95 ± 0,21	2	11,60 ± 0,42	2	12,95 ± 0,21
CIP1	4	8,65 ± 0,13	3	9,73 ± 0,25	3	10,26 ± 0,40	3	12,67 ± 1,21	3	14,30 ± 1,91
CIP10	4	8,32 ± 0,25	4	9,52 ± 0,48	3	9,97 ± 0,35	2	12,15 ± 0,49	2	14,25 ± 0,35
CIP100	4	8,55 ± 0,45	3	9,77 ± 0,75	3	10,33 ± 0,29	3	11,96 ± 1,14	3	13,13 ± 1,19
CIP1000	4	8,70 ± 0,34	4	9,37 ± 0,09	3	10,47 ± 0,72	3	11,93 ± 1,11	3	13,43 ± 0,61
ENDO1	3	8,27 ± 0,32	3	9,40 ± 0,17	3	9,93 ± 0,74	1	12,90 ± 0,00	1	15,70 ± 0,00
ENDO10	4	8,27 ± 0,17	4	9,57 ± 0,22	4	10,52 ± 0,83	3	12,60 ± 0,72	3	14,67 ± 1,87
ENDO100	5	8,28 ± 0,45	5	9,14 ± 0,49	5	10,32 ± 0,81	4	13,15 ± 0,83	4	14,70 ± 0,57
ENDO1000	3	8,43 ± 0,57	3	9,77 ± 0,50	3	10,60 ± 0,79	2	13,25 ± 1,06	2	14,75 ± 0,71
Mezcla	4	8,35 ± 0,44	4	9,10 ± 0,29	3	10,07 ± 0,46	2	11,65 ± 0,92	2	13,05 ± 0,92

DE: desvío estándar; n: número de individuos en cada GE; LHC: longitud hocico-cloaca; cm: centímetro; GE: grupos experimentales; CN: control negativo; CV: control de vehículo; CP: control positivo con 100 µg/huevo de ciclofosfamida; CIP: distintas concentraciones de formulación de cipermetrina; ENDO: distintas concentraciones de formulación de endosulfán.

Luego de la exposición *in ovo* del EB2, los ejemplares nacidos que sobrevivieron hasta el año de vida no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el peso entre los diferentes GE y el CV al eclosionar ni en las demás mediciones tomadas trimestralmente ($p > 0,05$; *MLG*).

La LHC de los animales que perduraron más del año de vida luego de la exposición en el EB2 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales expuestos a los distintos GE y los del CV, tanto al eclosionar como en las demás mediciones trimestrales ($p > 0,05$; *MLG*).

Tampoco se observó efecto nido en el peso o la LHC de los ejemplares ni en los resultados de genotoxicidad ($p > 0,05$).

El análisis de regresión lineal mostró que no hubo relación entre la mortandad embrionaria o postnatal observada y la exposición a CIP ($p=0,643$, $R^2= 0,081$; $p=0,659$, $R^2= 0,074$, respectivamente) o a ENDO ($p=0,508$, $R^2= 0,492$; $p=0,644$, $R^2= 0,080$, respectivamente) o a la mezcla de los formulados testeados ($R^2=1,00$, en ambos casos; RLS), solo una relación negativa débil entre los valores de NI y la longitud ($p < 0,05$, $R^2= 0,1326$) y el peso ($p < 0,05$, $R^2= 0,139$) de los animales al eclosionar, que se ajustaron mejor al modelo cuadrático con un $R^2= 0,194$ ($p < 0,05$). También se observó una relación negativa débil estadísticamente significativa entre los valores de ANT y la LHC ($p < 0,05$, $R^2= 0,1505$), al igual que con el peso ($p_{\text{lineal}} < 0,05$, $R^2_{\text{lineal}}= 0,1793$) de las iguanas al eclosionar, aunque los valores se ajustaron mejor al modelo cuadrático con $R^2= 0,209$ ($p < 0,05$).

3.4. DISCUSIÓN

En la práctica agrícola argentina es común la aplicación de varios formulados individuales o en combinaciones, en sucesivos eventos de fumigación con fines de aumentar la eficiencia de los plaguicidas en la lucha contra las plagas. Hasta antes de su prohibición en nuestro país, el ENDO solía ser aplicado en conjunto con CIP y GLIF, principalmente relacionado con el cultivo intensivo de soja transgénica (Bejarano González, 2008). Por esta razón, varios estudios han documentado una gran variabilidad de concentraciones de ENDO (Lorenzatti *et al.*, 2008; Astoviza *et al.*, 2016), CIP y GLIF (Ronco *et al.*, 2016; Etchegoyen *et al.*, 2017; Primost *et al.*, 2017; Bonansea *et al.*, 2017; Alonso *et al.*,

2018) en distintos compartimentos ambientales de la matriz agrícola, lo que refleja el uso intensivo y desmedido de estos compuestos en las actividades agroproductivas (Demetrio, 2012). Y, por otro lado, cabe señalar que aproximadamente el 80 % de los plaguicidas alcanzan a los organismos no blanco debido a que se dispersan en el ambiente, y de una manera u otra, los organismos toman contacto con esos agentes químicos por absorción oral y dérmica (Mingo *et al.*, 2017). El gran inconveniente es que se conoce muy poco sobre la toxicidad de las mezclas en general, y menos aún sobre el posible efecto en los organismos de vida silvestre, en animales de cría y en los humanos, que viven en regiones donde se aplican. Este panorama pone de manifiesto la importancia del monitoreo espacial y temporal de los compuestos o de sus metabolitos en los compartimentos del ecosistema en riesgo (Stewart *et al.*, 2011), como de los efectos sobre las especies que habitan en esos ambientes. En este sentido, las pruebas de toxicidad con embriones (en inglés, *Early Life Stage test*) permiten evaluar los efectos no sólo sobre la supervivencia sino también sobre la morfogénesis (teratogénesis), aspectos que requieren de un análisis muy cuidadoso y detallado de los parámetros a evaluar (Svartz *et al.*, 2016).

3.4.1. ÉXITO DE ECLOSIÓN Y MALFORMACIONES EXTERNAS

En el periodo de incubación en las distintas temporadas reproductivas, se debieron descartar varios huevos en mal estado para evitar la proliferación de hongos y bacterias, que pudiera contaminar al resto de la nidada. No obstante, el éxito de eclosión fue cercano al porcentaje obtenido por el Proyecto Iguanas en las mismas temporadas reproductivas y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos GE, por lo que dicha mortandad embrionaria no se asoció en ningún caso al efecto de los tratamientos aplicados. La razón de la inviabilidad de los huevos no fue estudiada, aunque es posible que se hayan utilizado varios huevos no viables en los diferentes tratamientos de exposición como en los controles. Y esto sea resultado de la sensibilidad diferencial de los nidos utilizados. Estos errores involuntarios en la elección de los huevos, se puede deber a una particularidad de los huevos de *S. merianae* que poseen membranas corionalantoideas con aspecto opaco que dificulta la tarea de visualización de las condiciones internas del embrión y, por lo tanto,

resulta una desventaja a la hora de determinar la viabilidad de los embriones mediante la ovoscopía, un método que se aplica en otros reptiles como *C. latirostris* (Donayo *et al.*, 2002). En el caso del CP utilizado en el primer experimental de exposición a RU (EA1), la mayor concentración de CF (400 µg /huevo) mostró una elevada cantidad de huevos inviables que fueron descartados durante la incubación. En cambio, una concentración mayor de CF (700 µg /huevo) aplicada *in ovo* en ejemplares de *C. latirostris* indujo efectos teratogénicos, además de efectos genotóxicos (Poletta *et al.*, 2009). Esto podría indicar que los embriones de iguana overa son más sensible comparado con otras especies reptilianas, y posiblemente este compuesto indujo un gran daño en los organismos de tal corta edad. No obstante, la administración de 20 mg/kg de CF a hembras de ratones preñadas evidenciaron reabsorciones embrionarias tempranas sin inducir malformaciones (Gebhardt, 1970). De acuerdo con Wolf *et al.* (2008) la CF, al igual que otros compuestos promutagénicos que requieren activación metabólica dependen del sistema CYP450 y actúa a través de un amplio espectro de toxicidad inmediata y mecanismos citotóxicos.

La exposición de los embriones de *S. merianae* a concentraciones individuales de RU, CIP y ENDO y a la mezcla de estos compuestos, no afectó al éxito de eclosión ni indujo malformaciones externas en ninguno de los neonatos de los distintos nidos analizados. En el caso de la CIP, encontramos diferentes evidencias, nuestros hallazgos coinciden con lo observado por Hegazi (2002) en embriones de *Gallus domesticus*. Sin embargo, estudios más recientes realizados en embriones de esta misma especie evidenciaron que el piretroide generó alteraciones en parámetros morfométricos (peso al nacer), gran cantidad de malformaciones severas, así como mortalidad embrionaria (Ahmad *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2018). En 3 especies de anfibios se observaron resultados similares cuando fueron expuestos a 0,5 o 5 µg/l, concentraciones ambientalmente relevantes de este piretroide. Si bien el plaguicida no afectó el éxito de eclosión ni la supervivencia de los embriones, la exposición en el estadio larval sí generó anomalías de comportamiento e incremento de la mortalidad en la especie más sensible (Biga y Blaustein, 2013). En cuanto al ENDO, ciertos estudios han demostrado que la exposición a este compuesto durante el desarrollo embrionario y/o neonatal provocó anomalías en el desarrollo y en la reproducción de los organismos expuestos (Wessel *et al.*, 2007; Silva y Gammon,

2009). Wessel *et al.* (2007) evidenciaron que la exposición de la ostra *Crassostrea gigas* a ENDO indujo genotoxicidad a una concentración baja (150 nM), en tanto que la exposición al doble de esa concentración (300 nM) produjo embriotoxicidad, y los autores coinciden con nuestro trabajo en que el EC fue el método más apropiado para medir el daño al ADN. Sin embargo, la exposición de embriones de camarones afectó los tiempos de incubación, generando retrasos en el mismo sin modificar el éxito de eclosión o mortalidad (Wirth *et al.*, 2001).

El efecto por exposición crónica a la combinación de CIP y ENDO fue estudiada por Svartz *et al.*, (2016) en embriones y larvas de la especie anfibia, *Rhinella arenarum*. Los compuestos exhibieron una interacción sinérgica en ambos estadios por exposición crónica y produjeron una variedad de efectos adversos y malformaciones, más severas que las generadas por la exposición de los compuestos por separado. Esto tiene importancia porque el sinérgico ocurre a nivel ambiental y pueden afectar al desarrollo embrión-larva en *R. arenarum* (Svartz *et al.*, 2016) como también para otras especies que se encuentren en desarrollo. Brodeur *et al.* (2014) reportaron interacción sinérgica entre CIP y GLIF durante la exposición aguda de larvas de *R. arenarum* y observaron una altísima toxicidad, hasta nueve veces más que la predicha por el modelo de adición de concentración. Es probable que la propensión teratogénica de la combinación de plaguicidas implique más de un tipo de lesiones bioquímicas, moleculares o celulares, que pueda incluir una señalización celular alterada o interrumpida, una apoptosis inadecuada o un cierre defectuoso del tubo neural (Uggini *et al.*, 2010). Estudios recientes sugirieron que la administración de ácido L-ascórbico a los parentales que han sido tratados con CIP podría revertir eficazmente ciertas deformidades teratogénicas en los embriones (Assayed *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2018).

3.4.2. GENOTOXICIDAD DE FORMULADOS ESTUDIADOS

Los resultados de este capítulo se constituyen en los primeros datos de genotoxicidad inducida por formulaciones individuales a base de GLIF (Roundup®), ENDO (Galgofan®) y CIP (Atanor®), y la mezcla de estos compuestos, en eritrocitos de neonatos de *S. merianae* luego de la exposición *in ovo*. Los mismos, ponen en evidencia que el EC, comparado con los demás biomarcadores de

genotoxicidad aplicados, tuvo mayor sensibilidad para detectar el daño al ADN inducido por los plaguicidas testeados. Como control positivo se utilizó ciclofosfamida, un agente muy conocido por su alto poder genotóxico en diferentes especies incluidos los reptiles (Hayretdağ *et al.*, 2014). Si bien en un estudio previo en el marco de esta Tesis doctoral, se probó peróxido de hidrógeno como control positivo *in vitro* en la estandarización del EC (Capítulo II), en el desarrollo del primer experimental *in ovo* se decidió optar por el uso de la CF como CP *in vivo* y los resultados mostraron un nivel de daño al ADN mayor que el generado por el peróxido de hidrógeno. Esto evidencia el accionar de la CF como agente alquilante. No obstante, en comparación con el daño inducido por el formulado de RU, CIP y ENDO, se observa que la CF indujo menos daño que los tres plaguicidas.

En el experimental A (Tablas 3.6 y 3.9), la formulación de RU indujo en los ejemplares de iguana overa un incremento significativo de ID a concentraciones mayores a 100 µg /huevo, y entre las ANs, el NI y la ANT se detectaron altas frecuencias en algunas concentraciones. Sin embargo, el herbicida no indujo una FMN significativamente más alta que el CN.

En el primer Experimental B donde se evaluaron los efectos genotóxicos potenciales de las demás formulaciones testeadas, no se observó diferencias en los resultados para los 3 biomarcadores entre las distintas concentraciones de CIP y ENDO contra el CV. No obstante, tampoco hubo diferencias entre el CN y el CV, lo cual posiblemente se deba a la mayor dispersión de los datos del CV. A partir de estos resultados, se hizo la comparación de los resultados de genotoxicidad con el CN y se observó un incremento estadísticamente significativo en el ID de las concentraciones más altas de CIP (1000 µg/huevo) y de ENDO (100 µg/huevo; EB1, Figura 3.8). En el segundo experimental B, se observaron similares resultados en el ID de las mismas concentraciones de CIP, ENDO respecto del CV. Además, se obtuvo diferencia significativa en el ID de la mezcla de las 3 formulaciones (ENDO 10 µg/huevo, CIP 10 µg/huevo y RU 100 µg/huevo) comparado con el CV (EB2, Figura 3.11). En tanto que el ensayo de MN solo pudo evidenciar un incremento estadísticamente significativo del daño genotóxico en el grupo expuesto a la mezcla comparado con el CV.

La revisión bibliográfica mostró que la mayoría de los estudios de evaluación genotóxica de estas formulaciones se ha realizado en distintas especies de peces, y un número muy reducido en reptiles,

aunque en mayor o menor medida los resultados concuerdan con lo obtenido en este trabajo realizado en la iguana overa. En el caso de RU, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Cavalcante *et al.* (2008) quienes reportaron resultados positivos de genotoxicidad mediante el EC y negativos para la FMN y las ANs en eritrocitos de peces de la especie *Prochilodus lineatus*. Efectos genotóxicos similares se observaron en el pez *Corydoras paleatus* a distintos tiempos de exposición (3, 6, y 9 días) a RU (De Castilhos Ghisi y Cestari, 2013). En peces *Anguilla anguilla* se observó que las frecuencias de ANs en los eritrocitos aumentaron significativamente luego de tres días de exposición a RU, y en el caso del EC, los resultados demostraron un mayor aumento en el primer día de exposición y menor al tercer día (Guilherme *et al.*, 2014). Cavaş y Könen (2007) revelaron que la exposición a tres concentraciones RU (5, 10 y 15 ppm) produjo un aumento significativo de la FMN, las ANs y del ID a las 48, 96 y 144 horas después de finalizada la exposición en el pez *Carassius auratus*, aún. En el caso de especies reptilianas, *C. latirostris* ha sido el modelo de estudio para evaluar la genotoxicidad de estos mismos compuestos que hemos evaluado en *S. merianae*. Los estudios demostraron que la formulación de RU indujo altos niveles de daño al ADN medido por el EC, el ensayo de MN y otras ANs, luego de la exposición *in ovo* (Poletta *et al.*, 2009; López González *et al.*, 2017).

En relación con la formulación de ENDO, la gran mayoría de los trabajos se han realizado en distintas especies de peces. Dar *et al.* (2015) demostraron efectos genotóxicos medidos por el ensayo de MN y EC en peces *Carassius carassius*, que se correlacionaron con el aumento de daño oxidativo y alteraciones de enzimas antioxidantes. Es posible que esto mismo haya ocurrido en las crías de *S. merianae* expuestas a la concentración más alta de ENDO y en la mezcla, como resultado de la interacción con los otros plaguicidas evaluados. Otros trabajos demostraron que diferentes concentraciones subletales de este organoclorado generaron incrementos de daño al ADN en distintos tejidos (branquias, riñones y eritrocitos) de peces de las especies *Mystus vittatus* y *Channa punctatus* medido por el EC (Pandey *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2007) y aumentos en la frecuencia de MN y AN dependiente de las dosis utilizadas en eritrocitos de juveniles de la especie *Sparus aurata* (Neuparth *et al.*, 2006). También se observaron incrementos en las frecuencias de AN y de MN por

exposición aguda (0,02 µg/L y 5 µg/L, respectivamente) de peces de agua dulce *Australoheros facetus* (Crupkin *et al.*, 2013). Aunque las consecuencias de la genotoxicidad del ENDO a largo plazo aún no fueron elucidadas, podría relacionarse con mecanismos subyacentes en condiciones patológicas que se observaron en varios organismos tales como la anemia hemolítica y la isquemia (Valavanidis *et al.*, 2006). El estudio de Jones *et al.* (2016) refiere una amplia gama de efectos directos e indirectos del ENDO sobre los organismos no blanco, entre ellos, una interacción de forma aditiva con los depredadores de las especies involucradas, causando disturbios ecológicos y un posible impacto negativo en la dinámica de las poblaciones (Wessel *et al.*, 2007).

En torno a la CIP, la bibliografía consultada expone que la interacción de este piretroide con embriones en desarrollo puede dar diversos resultados toxicológicos como daños en las membranas celulares, en el ADN y en las estructuras cromosómicas que pueden conducir a apoptosis en diversos tejidos y órganos embrionarios, incluyendo una toxicidad en el desarrollo neurológico (Abdul-Hamid *et al.*, 2017). En las células sanguíneas, la CIP puede ejercer 2 modos de acción: generar estrés oxidativo principalmente por la interrupción de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Abdul-Hamid *et al.*, 2017), o puede acumularse en las membranas celulares por ser un componente hidrofóbico, y alterar las estructuras de las mismas (Summaira Sharaf *et al.*, 2010). En este contexto, es posible que la incidencia de ID observada en las crías de iguanas expuestas a CIP (EB, Fig. 3.8 y 3.11) pueda deberse a la generación de estrés oxidativo que indirectamente indujo daño al ADN. La exposición de embriones de pollo en desarrollo a una formulación combinada de los insecticidas clorpirifos y CIP, en 3 dosis (0, 0,01, 0,05 y 0,1 µg/huevo) administrada por inyección fue capaz de inducir daño al ADN medido por el ensayo de MN y el EC (Uggini y Suresh, 2013). Los autores, además, observaron que la CIP puede inducir potencialmente cambios en la morfología normal de los eritrocitos, y cambios citotóxicos que inhiben la eritropoyesis y la diferenciación celular en la línea eritroide. Resultados similares fueron observados por Summaira Sharaf *et al.* (2010) en pollos de engorde, donde los animales tratados mostraron eritrocitos con MN y varias AN.

La revisión bibliográfica de Rizzati *et al.* (2016) señala que los efectos combinados en las mezclas se producen incluso cuando todos los componentes están presentes en dosis inferiores a las que

causarían efectos observables individualmente. Esto concuerda con el resultado obtenido para *S. merianae*, donde la mezcla de los plaguicidas que se utilizó contenía las concentraciones más bajas de cada formulación que no habían generado efectos genotóxicos individualmente en los experimentales anteriores (EA para RU y EB para CIP y ENDO). Así, la mezcla mostró mayor daño al ADN que los formulados en forma independiente, luego de exposición durante el período embrionario. Es posible que esto se deba a la acción conjunta de los compuestos, lo que generó un efecto potenciador entre dos o más compuestos. No obstante, estos resultados corresponden a un solo ensayo de la mezcla y se requiere de una evaluación más exhaustiva para aseverarlos. Resultados similares de genotoxicidad fueron observados en *C. latirostris* en una simulación de una exposición ambiental de nidos a la formulación de GLIF solo y a la mezcla de las mismas formulaciones utilizadas en el presente Capítulo, donde la mezcla mostró mayor daño al ADN que el inducido por GLIF solo (Poletta *et al.*, 2011). Los autores observaron, además, alteraciones enzimáticas y metabólicas, así como retraso en el crecimiento de los neonatos expuestos *ex situ* durante el desarrollo embrionario. López González *et al.* (2019) demostraron el efecto genotóxico (FMN, BN y Eritrocitos Binucleados) inducido en neonatos por la exposición *in ovo* a la mezcla de formulaciones de GLIF, CIP y clorpirifos. Los autores consideran que la presencia de CIP en la mezcla suprimiría el efecto antagonista observado entre GLIF y clorpirifos. La CIP no aumentaría la toxicidad de las mezclas binarias donde está presente (GLIF-CIP y CIP-clorpirifos), porque el efecto observado en estas mezclas es similar al efecto encontrado para las formulaciones individuales de GLIF y clorpirifos (Poletta *et al.*, 2017; López González *et al.*, 2019). Son más difíciles de predecir y comprender los efectos cuando la mezcla se compone de diversas clases de plaguicidas, dado que las propiedades químicas de cada formulación, la toxicocinética, las vías metabólicas, la interacción con otros compuestos y el mecanismo de acción de cada tóxico, pueden producir efectos muy variables. La identificación de las características centrales de las mezclas de plaguicidas a nivel molecular, como los perfiles de expresión génica, podría ser útil para evaluar o predecir la aparición de efectos interactivos que den lugar a respuestas imprevistas (Hernández *et al.*, 2017).

El daño genético puede ser inducido por estrés oxidativo, exposición a agentes clastogénicos o aneugénicos, defectos en los puntos de control del ciclo celular y/o en mecanismos de reparación del ADN, por deficiencias de cofactores en el metabolismo del ADN, como también fallas en la segregación de los cromosomas (Iarmarcovai *et al.*, 2008). Estos efectos genotóxicos se pueden establecer como consecuencia de una cascada de eventos, no son respuesta a un único contacto puntual con el agente, podemos generalizar diciendo que dan comienzo con la exposición y terminan con la expresión de uno o más puntos finales que expresan el daño evaluable mediante distintos parámetros (Mudry y Abrevaya, 2006). En este sentido, la aplicación de los tres biomarcadores en conjunto utilizados en esta Tesis doctoral permitió una evaluación de más de punto final donde puede expresarse el daño genético inducido por los agentes químicos analizados. Los resultados de este Capítulo indican una mayor sensibilidad del EC en comparación con los otros biomarcadores utilizados, debido a que puede detectar un mayor rango de alteraciones moleculares. La sensibilidad diferente de cada ensayo se debe a que miden diferentes puntos finales de acción en el ADN (Oliveira *et al.*, 2010).

La acumulación de daño puede ocurrir ya sea a través de un aumento en el número de eventos que dañan el ADN o debido a una disminución de la capacidad de reparación del daño al DNA y/o del sistema antioxidante (Costa *et al.*, 2008). En el caso de RU, hay estudios que indican que el herbicida puede ejercer acciones inhibitorias sobre la maquinaria de reparación de daño al ADN (Marques *et al.*, 2014), retraso en la cinética de la primera división celular en células embrionarias de erizo de mar debido a que el formulado a una concentración muy baja (10 mM) inhibió la síntesis de ADN que ocurre en la fase S del ciclo celular, en consecuencia, se activó el *checkpoint* en la transición G₂/M impidiendo la progresión del ciclo celular (Marc *et al.*, 2002, 2004), también puede perturbar la actividad de la enzima aromatasas (responsable de la síntesis de estrógenos en mujeres) presente en la placenta humana (Richard *et al.*, 2005) y suprimir la actividad de las enzimas del citocromo P450 (CYP) e interrumpir la biosíntesis de aminoácidos aromáticos por las bacterias intestinales en humanos (Gill *et al.*, 2018). Otro estudio demostró que la exposición de lagartos *Podarcis siculus* a dosis (0,05 y 0,5 g/kg de peso corporal en 50 L de agua de grifo) de GLIF puro administrado por vía oral pudo generar daños en el parénquima hepático dependiente de la dosis. La presencia de

melanina fue atribuida al estrés oxidativo inducido en los hepatocitos, debido a que representa una respuesta celular para eliminar los radicales libres. Además, observaron un aumento generalizado en el glucógeno hepático, independientemente de la dosis (Verderame y Scudiero, 2019).

La genotoxicidad del ENDO y sus metabolitos parece estar mediada por la producción de oxirradicales (Wessel *et al.*, 2007) dado que puede interactuar directamente con el ADN provocando la formación de aductos o sitios álcali lábiles o mediante la producción de estrés oxidativo (Bajpayee *et al.*, 2006), y un comportamiento aneugénico en plantas (Pérez *et al.*, 2011). Por su parte, la CIP se metaboliza en cianhidrinas que se descomponen en cianuros y aldehídos, y se ha descrito que estos pueden inducir estrés oxidativo al igual que el ENDO (Leja-Szpak *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta lo comentado, es posible que las concentraciones más altas de CIP y ENDO hayan inducido estrés oxidativo en los eritrocitos, causando daño genotóxico que se evidenciaría por el aumento significativo en el ID. En tanto que la falta de diferencia significativa en las frecuencias de MN y de algunas AN en los individuos expuestos a las formulaciones plaguicidas evaluadas respecto de los controles puede explicarse por la eliminación efectiva de los eritrocitos dañados de la circulación, a nivel del bazo principalmente, como un mecanismo de protección (Pacheco *et al.*, 2005; Cabarcas-Montalvo *et al.*, 2012). También es posible que la dispersión de los datos y el *n* de individuos en cada GE pudo interferir en la ausencia de diferencias significativas observadas en los distintos experimentales, a excepción de la mezcla.

La presencia de MN en los eritrocitos periféricos en circulación sanguínea es el resultado del equilibrio dinámico entre la formación de células micronucleadas y su eliminación (Marques *et al.*, 2014). Aún no se han encontrado agentes que puedan causar aberraciones o reordenamientos estructurales sin producir fragmentos cromosómicos acéntricos asociados. Por lo tanto, los micronúcleos deberían ser un índice confiable de daño cromosómico (Chung *et al.*, 2011). De acuerdo con la bibliografía, la detección de MN junto con otras ANs en los eritrocitos (enfoque citoma), tal como se pudo evidenciar en los animales expuestos a RU en este Capítulo, proporciona un índice de daño genético acumulado durante el tiempo de vida de estas células (Polard *et al.*, 2011). Por otra parte, Martínez-Silvestre *et al.* (2011) sugieren que las AN son indicativas de que los organismos

tienen una respuesta regenerativa marcada ante una anemia, a la salida de la hibernación, incidencia de una enfermedad inflamatoria importante o malnutrición. Aunque no se comprenden los mecanismos responsables de estas lesiones, su aparición está relacionada con un proceso de reparación y eliminación de cromatina cuando se detecta una región del ADN afectada. Esa región se mueve luego a la periferia del núcleo y antes de que se elimine por exocitosis, la membrana nuclear exhibe ciertas figuras, caracterizando las AN (Fenech *et al.*, 2011). Específicamente, los BN constituyen un mecanismo para eliminar el ADN amplificado en la fase S del ciclo celular (Fenech y Crott, 2002). Estos autores indican una fuerte correlación entre los BN y FMN asociada a la inestabilidad genómica. En la mayoría de las muestras sanguíneas de las iguanas expuestas a cada formulado individual o a la mezcla correspondiente a las observaciones desarrolladas en este Capítulo, se ha observado la presencia de eritrocitos anucleados y núcleos excéntricos, aunque las frecuencias observadas no fueron suficientes para establecer una diferencia significativa respecto de los controles (EA para RU y EB para CIP y ENDO). Los núcleos excéntricos también fueron observados en otras especies que habitaban ambientes contaminados con diferentes agentes genotóxicos (Sawhney y Johal, 2000; da Silva Souza y Fontanetti, 2006). Los núcleos irregulares parecen no formar parte de las observaciones en otras especies, sin embargo, en las muestras de iguana overa expuestas a ciertas concentraciones de RU (200 y 800 $\mu\text{g}/\text{huevo}$) la frecuencia observada para esta categoría alcanzó para evidenciar una diferencia significativa en relación con el CN (EA2, Tabla 3.10). Hasta el momento de la redacción de esta Tesis, no se ha podido encontrar ninguna explicación en la bibliografía disponible al respecto. Una posible explicación podría atribuirse a una intensa actividad nuclear previa a la formación de MN o a otro tipo de AN. Mientras que en la concentración más alta de RU (1600 $\mu\text{g}/\text{huevo}$) en el EA2, la disminución de NI podría interpretarse como un efecto citotóxico (Tabla 3.10).

3.4.3. CRECIMIENTO POSTNATAL

En los estudios que se informan en el presente Capítulo se registraron muertes embrionarias durante la incubación como también muerte de algunos individuos durante el periodo de crianza

hasta los 9 meses de vida, evento considerado sin asociación con la exposición a los plaguicidas evaluados debido a que se registraron igual o incluso mayor número de muertos en el CN que en algunos grupos expuestos, lo cual fue respaldado por una ausencia de relación entre la exposición y la mortalidad embrionaria o postnatal ($p > 0,05$ en todos los casos; RLS). Por otro lado, no fue posible llevar a cabo mediciones de la concentración de los plaguicidas en sangre debido a la imposibilidad de coleccionar suficiente cantidad de muestra en animales recién nacidos y la falta de un laboratorio que realice las determinaciones en esta matriz en el momento de la realización de esta tesis. Por esta razón, no se realizaron estudios complementarios para averiguar la causa de las muertes, principalmente debido a que el éxito de eclosión y la supervivencia postnatal obtenidos en los experimentales coincidieron con los reportados por el PI para las mismas temporadas, por lo que se infirió estar ante valores considerados como normales.

Las iguanas overas que fueron expuestas durante su desarrollo embrionario a los distintos plaguicidas mostraron un crecimiento postnatal muy heterogéneo de acuerdo al tipo de plaguicida. Al momento de la eclosión, el peso y la talla de los neonatos de la iguana overa fueron similares en todos los grupos experimentales. Nuestros resultados coinciden con lo obtenido en el trabajo de López González *et al.* (2017) para *C. latirostris*, donde las mismas formulaciones de GLIF, CIP y ENDO no generaron ningún efecto sobre los parámetros morfométricos de los animales al nacer. En cambio, la exposición *in ovo* a ENDO (grado técnico) en esta última especie reptiliana (Beldomenico *et al.*, 2007), así como la más alta concentración (11,206 ppm) de otra formulación de GLIF (Glypro®; Sparling *et al.*, 2006) en *Trachemys scripta elegans*, sí indujeron bajo índice de condición corporal y una masa reducida en los neonatos. Analizando el crecimiento posterior de los animales durante el primer año de vida, se observó que la concentración intermedia y la más alta de RU provocaron un retardo en el crecimiento corporal (LHC y peso) a los 3 y 6 meses post-exposición. Después de este lapso, todos los animales expuestos a RU lograron un crecimiento semejante al CN, situación que no se observó con los expuestos al CP, que mantuvieron un menor crecimiento en peso y longitud corporal. En el trabajo de Poletta *et al.* (2011) los autores también observaron un retraso en el crecimiento a los 3 meses de edad en *C. latirostris* expuestos *in ovo* a RU de forma semi-natural. Estos

resultados podrían estar asociados a los hallazgos obtenidos por diferentes estudios. Ugarte (2014) realizó un modelado molecular mediante software y pudo inferir que la formulación de GLIF inhibe la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a través de la interacción con el sitio de unión de la enzima, generando el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, un proceso metabólico vital de síntesis de ATP (Peixoto, 2005). Esto conlleva a que la energía derivada de los nutrientes no se almacene en los enlaces de alta energía de los ATP, ocasionando pérdida de energía, y en casos más graves, incluso podría conducir a la muerte de los organismos (Carpenter *et al.*, 2016). Un estudio reciente comprobó que las tortugas verdes (*Chelonia mydas*) expuestas al GLIF manifestaban tener un menor crecimiento o poca supervivencia de las bacterias intestinales, lo cual podría conducir a efectos adversos sobre la digestión y, por ende, repercutir en la salud general de las tortugas (Kittle *et al.*, 2018). Por el contrario, otro estudio indica que la exposición de lagartos de la especie *Oligosoma polychroma* a la formulación a base de GLIF “Yates Roundup Weed killer” indujo un aumento de la temperatura corporal de los animales, lo que contribuyó al aumento del metabolismo de los lagartos para frustrar el estrés fisiológico causado por el herbicida (Carpenter *et al.* 2016). Es de amplio conocimiento que la temperatura es un factor especialmente importante para el crecimiento de los reptiles, así como también la iluminación. Se ha observado que, al proporcionar lámparas de calor, la toxicidad del piretroide en estudio disminuyó considerablemente (Sparks *et al.*, 2015). Algunos compuestos de esta familia de plaguicidas manifiestan una toxicidad reducida en los organismos ectotérmicos a temperaturas más altas que las óptimas previstas para la acción del compuesto. Debido a que las tasas metabólicas de los reptiles varían con la temperatura ambiental, se esperaría que la sensibilidad de los individuos a un plaguicida también varíe en función de este factor (Weir *et al.*, 2015). Ante un evento de exposición, los ectotermos tienden a buscar un microambiente más cálido para aumentar su respuesta metabólica contra la intoxicación, a diferencia de los mamíferos que tienen una respuesta fisiológica opuesta (Grue *et al.*, 2002). En este contexto, es posible que la temperatura de la sala de crianza (menor a 30°C) donde se mantuvieron los individuos de iguana overa haya interferido en la toxicidad de los plaguicidas a los que estuvieron expuestos *in ovo* (CIP, ENDO y mezcla), ya que el crecimiento corporal no mostró diferencias con los

controles para ninguna de las mediciones trimestrales. Estos resultados coinciden con los obtenidos en *C. latirostris* luego de similares condiciones de exposición *in ovo* a los mismos formulados individuales, y por la exposición *in vivo* subcrónica de neonatos a distintas mezclas binarias (GLIF-clorpirifos, GLIF-CIP, CIP-clorpirifos), donde el crecimiento de los animales expuestos en los distintos experimentales no se vio alterado por la acción de ningún plaguicida individual o las mezclas evaluadas (López González *et al.*, 2017, 2019). Teniendo en cuenta que las iguanas como cualquier reptil presentan una longevidad característica, la falta de efecto de los estos plaguicidas sobre el crecimiento de los ejemplares puede no ser evidenciado a corto plazo, y se requiere de un seguimiento a largo plazo más prolongado, dado que en este periodo los animales crecen rápidamente hasta alcanzar un umbral de tamaño corporal que los favorezca en la supervivencia para evitar ser depredado (Mitchelmore *et al.*, 2005). Por lo que la ausencia de factores como la depredación, la búsqueda de alimentos u otros condicionantes en la supervivencia de los organismos durante la crianza controlada, conduciría a un equilibrio en los procesos bioenergéticos subyacentes presentes en los animales tales como asimilación de energía y gasto metabólico, permitiendo un crecimiento dentro de los parámetros normales. Por otra parte, puede ser que las concentraciones de plaguicidas aplicadas no fueran suficientes como para generar un desequilibrio en estos procesos bioenergéticos. La sensibilidad de un animal a un contaminante probablemente varíe dependiendo del estado fisiológico de ese animal (Hall, 1980).

En términos generales, los efectos nocivos que ejercen las plaguicidas sobre los organismos ponen de manifiesto la escasa seguridad de las formulaciones comerciales para la salud animal y el ecosistema entero. Por lo tanto, es necesario la evaluación completa de las formulaciones de los plaguicidas antes de la aprobación para su comercialización, considerando las distintas condiciones ambientales de los compartimentos donde habitan diferentes especies y sus características biológicas (Schaumburg *et al.*, 2016). Esto debería registrar todos los componentes incluido los ingredientes inertes que contienen las formulaciones, y su posterior monitoreo ambiental espacial y temporal, con el fin de establecer medidas seguras y evitar efectos adversos en los organismos y el ambiente (Cox y Sorgan, 2006; Mansour, 2008). Los efectos subletales como la inmunosupresión, las

alteraciones endocrinas y los daños genotóxicos cobran una gran importancia ya que en conjunto pueden afectar la supervivencia de las especies, y en consecuencia, afectar severamente el equilibrio de la biodiversidad (Mann *et al.*, 2009; Meza-Joya *et al.*, 2013), y en el caso del daño genotóxico, puede resultar en constituirse en etapas iniciales de posteriores desarrollos de procesos carcinogénicos o deterioro reproductivo (Guilherme *et al.*, 2010).



CAPÍTULO IV:

Exposición de juveniles de

***Salvator merianae* a**

plaguicidas bajo

condiciones semi-

controladas



4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. FUNDAMENTOS DEL DISEÑO

La evaluación de los efectos genotóxicos de diferentes plaguicidas, incluyendo organofosforados, organoclorados y piretroides, se ha basado primordialmente en ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados en condiciones de laboratorio (Vieira *et al.*, 2014; de Santo *et al.*, 2019). Estos estudios permiten una comprensión de lo que acontece en las células y en los organismos, ya que proporcionan información apropiada y útil sobre la concentración efectiva y sobre los criterios de valoración aguda y crónica (de Santo *et al.*, 2019). Sin embargo, los estudios en poblaciones a campo adquieren mayor relevancia por ser los más apropiados para monitorear los efectos de los plaguicidas sobre los organismos en su ambiente y condiciones de vida naturales. Estos estudios son dificultosos para replicar por la complejidad y variabilidad de los ambientes naturales que involucran factores múltiples y sinérgicos o incluso antagónicos, difíciles de reproducir en un diseño experimental (Van den Brink *et al.*, 2005). Los efectos de un contaminante en situaciones naturales pueden ser alterados o enmascarados por la presencia de factores bióticos (competición, predación) o abióticos (temperatura, humedad, lluvias), o por la interacción con otros contaminantes (Amaral *et al.*, 2012a). En este contexto, una simulación de la exposición a plaguicidas bajo condiciones semi-controladas se constituye en un puente entre estudios de laboratorios y el monitoreo realizado netamente a campo. Este sistema admite un escenario de exposición más realista ya que se realiza en condiciones naturales, manteniendo el control sobre algunas de las variables que pueden incidir sobre los resultados de la exposición, sin llegar a tener la complejidad de un mesocosmo (Alexander *et al.*, 2016).

Las formulaciones plaguicidas son en sí mismas mezclas de principios activos y otros ingredientes considerados inertes que se incorporan al producto final para aumentar la solubilidad, o bien la absorción en las especies blanco, entre otros tantos efectos (Zeliger, 2011). Además, estos compuestos se emplean frecuentemente de manera generalizada en mezclas complejas de herbicidas, fungicidas e insecticidas que se aplican a distintos cultivos (soja, maíz, algodón, frutas y verduras) para mejorar la eficiencia y racionalizar los costos por el tiempo que se invierte en las

aplicaciones, sin atender a los posibles inconvenientes secundarios que esto puede acarrear. Como resultado, los plaguicidas están ampliamente presentes como mezclas en todos los compartimentos del medio ambiente. Aunque la exposición a nivel ambiental sea a concentraciones bajas, la bibliografía indica que estas combinaciones serían responsables de los diferentes efectos observados también en los organismos no blanco (Svartz *et al.*, 2016a; López González *et al.*, 2019; Mestre *et al.*, 2019). Esos efectos sub-letales orientan acerca de la sensibilidad de los organismos a los contaminantes ambientales que pueden ser riesgosos por conducir a eventos perjudiciales a nivel poblacional. Abarcan una amplia gama de consecuencias que van desde cambios hormonales y respuestas enzimáticas, estrés oxidativo, efectos neurotóxicos e inmunosupresión (Bicho *et al.*, 2013; Mingo *et al.*, 2017; Verderame y Scudiero, 2019). Se ha descrito también el aumento de la vulnerabilidad a la depredación y reducción en la aptitud animal (en inglés *fitness*), entendiéndose este último como varios procesos fisiológicos que desempeñan un papel fundamental en la capacidad del animal para adquirir alimentos u otros recursos, aparearse o defender su territorio con éxito (Amaral *et al.*, 2012b; Svartz *et al.*, 2016b; Frossard *et al.*, 2019), además de efectos perjudiciales en la reproducción y en el desarrollo de los organismos que forman parte del bioma de esa zona expuesta a los diferentes plaguicidas (Arukwe *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). A pesar de los estudios que demuestran que las mezclas pueden producir una mayor toxicidad para el medio ambiente en comparación con los ingredientes activos o productos comerciales aplicados individualmente, las mezclas no se consideran en los esquemas regulatorios de evaluación de riesgos de plaguicidas (Ockleford *et al.*, 2018; de Santo *et al.*, 2019). Si bien la predicción del riesgo de exposición a las mezclas de plaguicidas es compleja, es sabido que los compuestos pueden interactuar en términos de toxicocinética y toxicodinámica, causando efectos mayores o menores respecto de cuando se aplican solos, o simplemente por acción de la suma del efecto individual de cada plaguicida, conduciendo a efectos impredecibles (Hernández *et al.*, 2017).

La revisión de la literatura sobre ecotoxicología indica que los reptiles a pesar de ser identificados por algunos autores constituyendo un grupo más vulnerable que otros vertebrados, no son incluidos habitualmente en las pruebas de toxicidad y en lo que hace a nuestro conocimiento, no existirían

lineamientos de pruebas estándar, así como tampoco suficiente información sobre su sensibilidad a los plaguicidas (De Lange *et al.*, 2009; Pauli *et al.*, 2010; Ockleford *et al.*, 2018). En los reptiles, la exposición a contaminantes puede ocurrir a través de la dieta, el consumo de agua, por vía dérmica y/o inhalación. En el caso de los embriones, la exposición se puede dar por transferencia materna o, en las especies ovíparas, a través de la cáscara del huevo desde el medio ambiente durante el período de incubación. En el conocimiento de las vías de exposición cobran gran importancia las propiedades físicas y químicas de los xenobióticos, las condiciones metabólicas y fisiológicas de los animales, así como los hábitos alimenticios sólo por citar algunos factores (de Solla, 2016). En general, en la evaluación del riesgo ecológico, la ruta de exposición de mayor consideración es la dieta (Weir *et al.*, 2010). Sin embargo, la exposición dérmica puede ser más significativa en reptiles, debido a que ellos tienen un alto porcentaje de la superficie corporal con mayor proximidad al suelo que otros vertebrados (Weir *et al.*, 2015). De acuerdo a lo expuesto, este capítulo presenta una instancia de evaluación cuyo objetivo es determinar los posibles efectos subletales en juveniles de *S. merianae* expuestos en forma semi-controlada y subcrónica (3 meses de duración) a una mezcla de plaguicidas de amplio uso en las prácticas agrícolas en cultivos extensivos de nuestro país, simulando las condiciones de exposición posibles de poblaciones de iguana overa ambientalmente expuestas a mezclas de plaguicidas en sus áreas de distribución natural.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. JUVENILES DE IGUANA OVERA

Para este capítulo se utilizaron ejemplares juveniles de 12 meses en el primer ensayo y de 24 meses de edad en el segundo ensayo. Estos individuos provinieron de huevos colectados en la Reserva Natural Manejada “El Fisco” (ver apartado 2.2.1.2), individualizados luego del nacimiento mediante el corte de uña-falange (ver apartado 3.2.4.3.1.2), y criados bajo condiciones controladas como parte del PI (Lab. Zool. Aplic., FHUC/MMA), como fue descrito en el apartado 2.2.1.2, hasta el

inicio del experimento. Una semana previa a la experimentación, los animales fueron ubicados en los recintos para permitir su aclimatación.

4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.2.2.1. Experimentales

El experimental se llevó a cabo en dos oportunidades en temporadas cálidas consecutivas (primavera-verano). La primera vez se realizó desde diciembre de 2013 hasta marzo de 2014, y la segunda vez se realizó desde noviembre de 2014 a febrero de 2015. En ambos casos, las condiciones ambientales de temperatura y régimen de lluvias permitieron el desarrollo normal del experimental.

4.2.2.2. Características de los recintos

Dentro de las instalaciones donde funciona el PI, ubicado en el predio de la Estación Zoológica Experimental “Granja La Esmeralda”, Santa Fe, Argentina, se construyeron dos recintos a la intemperie con una separación aproximada de 50 m entre los mismos. Los recintos de forma cilíndrica tenían 2 m de diámetro por 1,20 m de altura, por sobre la superficie del terreno dado que las bases de los mismos fueron enterradas aproximadamente 0,30 m, y se les añadió un tejido de plástico de trama pequeña (1 cm x 1 cm) para evitar el escape de los animales. Las paredes de cada recinto estaban formadas por una malla de alambre, y el techo estaba completamente cerrado con el mismo tejido de plástico utilizado en la base para evitar la huida de los animales e impedir el ingreso de depredadores (adaptado de Chani *et al.*, 1993). Al enterrar la base, ésta se cubrió con tierra y vegetación para proveer de un lugar adecuado para el desplazamiento de los ejemplares en observación. Además, sobre el techo y en los laterales se colocaron tramos de tejido de “media sombra” para reducir la incidencia directa del sol sobre los animales sin impedir la ventilación. En cada uno de los recintos, los animales tenían dos comederos, un bebedero y refugios donde ocultarse (Fig. 4.1).

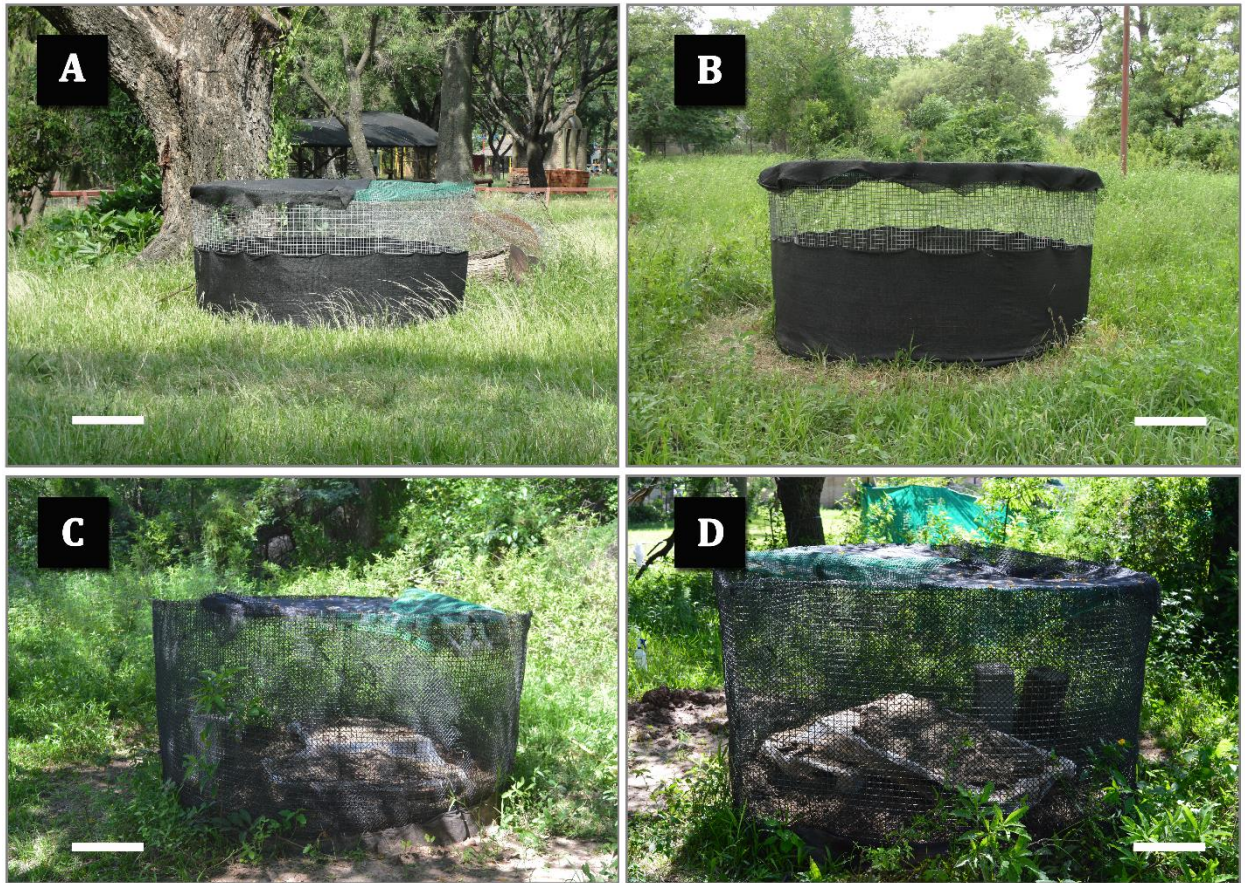


Figura 4.1. Recinto tratado con los agroquímicos: A) al inicio y, B) al final del experimental donde se muestra el efecto del herbicida sobre la vegetación alrededor del recinto. Las fotos fueron tomadas desde diferentes ángulos. Barras (color blanco) = 50 cm. Recinto control: C) al inicio, y D) al final del experimental donde se observa que no hubo cambios en la vegetación. Barras (color blanco) = 35 cm

La distribución de los animales entre los 2 recintos se realizó en forma equitativa y homogénea en cuanto al tamaño de los animales, en ambos experimentales (n total =44 en el 1er ensayo y 60 en la repetición). En ambos casos, el experimental tuvo una duración de 3 meses.

4.2.2.3. Alimentación

Las iguanas fueron alimentadas cuatro veces por semana, alternando con días de limpieza de los recipientes donde se colocaba la comida. Se utilizó la misma alimentación (ver apartado 2.2.1.2) con la que fueron criadas hasta el momento de la realización de estos experimentales.

4.2.2.4. Exposición

Estos experimentales tuvieron la finalidad de simular el escenario posible de exposición de poblaciones que viven en parches de ambientes naturales rodeados por áreas de cultivos de soja principalmente, en algunos casos con sistemas de rotación anual con otros cultivos como trigo y maíz, donde acontecen las fumigaciones con mezclas de plaguicidas en forma reiterada a lo largo del año.

El recinto utilizado como "tratamiento" recibió dos pulverizaciones con las formulaciones de los agroquímicos bajo estudio, mientras que el recinto "control" fue pulverizado sólo con agua potabilizada en las dos aplicaciones realizadas (Fig. 4.1). En ambos ensayos, la primera pulverización se realizó al inicio del experimental (día 1) con la formulación RU, y la segunda aplicación se realizó al mes (día 31) con la mezcla de formulaciones de RU, CIP y ENDO, la elección de los tres plaguicidas que se evaluaron en el marco de esta Tesis es debida a su frecuente e intensa aplicación en la región. Cabe destacar que esta situación ya no se cumple actualmente para el ENDO debido a su prohibición, tal como fuera explicado en el Capítulo I, aunque sí se ha intensificado en el caso del GLIF y la CIP. Estos compuestos fueron los mismos que se emplearon en los experimentales de exposición *in ovo*, descritos en el Capítulo III.

Las aplicaciones se realizaron mediante un pulverizador de mano, rociando toda la superficie del recinto (2 m de diámetro) más el borde exterior de aproximadamente 25 cm (como se observa en la Figura 4.1B), desde una altura de 50 cm para permitir la dispersión homogénea de la mezcla de plaguicidas en toda la superficie de interés, cubriendo un área total de 4,90 m². Para esto, se tuvieron en cuenta las condiciones climáticas del día de la aplicación y el pronóstico para los días posteriores, evitándose los días ventosos y las precipitaciones. Además, se tomaron los recaudos necesarios para cuidar la salud del aplicador, como el uso del equipo de protección personal completo (traje impermeable con capucha, botas, guantes, barbijo y gafas de protección). Las concentraciones utilizadas correspondían a las recomendadas en los cultivos de soja, calculadas en función del área

de los recintos (2,50 m de diámetro total= 4,90 m²) en un volumen correspondiente de agua potable de 50 mL (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Dosis de agroquímicos aplicadas a campo y su equivalente aplicado en el experimental bajo condiciones ambientales semi-controladas.

Agroquímico	Abreviatura	Concentración del principio activo en la formulación (% p/v)	Concentración aplicada
Roundup® Full II	RU	66,2	2 % = 2 L/100 L agua /ha
Cipermetrina Atanor®	CIP	25	0,12 % = 0,12 L/100 L agua /ha
Endosulfan Galgofan®	ENDO	35	0,85 % = 0,85 L/100 L agua /ha

Las aplicaciones se realizaron siguiendo el cronograma del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en las prácticas agrícolas en la región, y se efectuaron en las horas tempranas de la mañana. Para evitar la acción directa de los plaguicidas sobre los animales durante las fumigaciones, los mismos fueron retirados de los recintos antes de cada aplicación, y fueron devueltos a los mismos luego de 10 horas post-aplicación.

4.2.3. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Al finalizar cada repetición del experimental, se tomaron muestras de sangre periférica (50 µL) a todos los animales, de acuerdo a lo descripto en el apartado 2.2.3 (Capítulo II).

4.2.4. VARIABLES REGISTRADAS

4.2.4.1. Datos morfométricos

Al inicio y al final de cada experimental, los animales fueron medidos con una cinta métrica metálica (0,1 cm de precisión) y pesados con una balanza eléctrica Electronic Compact Scale, TH 5000 (1 g de precisión).

4.2.4.2. Genotoxicidad

A partir de las muestras de sangre se realizaron 2 preparados por individuo para la aplicación del EC, el Ensayo de MN con enfoque citoma (MN-citoma) siguiendo las condiciones mencionadas en el Capítulo II y en el Capítulo III, respectivamente.

4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de cada variable registrada en ambos ensayos fueron analizados mediante la prueba de Rachas (Conover, 1998; Montgomery, 2004) para determinar la independencia de los datos en cada recinto, tomando como valor de corte la media muestral. Además, se probaron los supuestos de normalidad (Test de Kolmogorov-Somirnov) y homogeneidad de varianzas (Test de Levene). Tanto en el primero como en el segundo ensayo, se realizó el análisis de los valores iniciales de peso y LHC de los animales entre los recintos mediante el test paramétrico *T de Student*, para verificar la distribución equitativa de los animales entre los recintos. Al finalizar los experimentales, se analizó el incremento del peso y la LHC (crecimiento) calculados como la diferencia entre los valores finales menos los valores iniciales.

En el primer ensayo, los valores de morfometría, las frecuencias de brotes y muescas nucleares, núcleos excéntricos y AN totales se analizaron mediante el test paramétrico *T de Student* para comparar los datos del grupo tratado respecto del grupo control. Mientras que los datos de ID, la FMN, núcleos irregulares y células anucleadas no cumplieron con los supuestos necesarios, por lo que se aplicó el test no paramétrico *Mann-Whitney*.

En el segundo ensayo, los valores de morfometría, frecuencias de brotes y muescas nucleares, núcleos irregulares y excéntricos, eritrocitos anucleados y AN totales fueron analizadas por *T de Student*; mientras que, la FMN y los valores de ID fueron analizados por *Mann-Whitney*. Para analizar si el nido de origen de los animales tuvo incidencia sobre los valores obtenidos para cada biomarcador y parámetros morfométricos, se empleó un *ANOVA de una vía* y comparaciones múltiples de *Tukey*, considerando a los distintos nidos como variable de agrupamiento y los

biomarcadores como variables de respuesta en ambos ensayos. Para establecer relaciones entre las medidas morfométricas y las frecuencias de MN como de cada categoría de AN e ID se aplicaron regresiones lineales simples (RLS). En todos los casos, se consideró como estadísticamente significativo el valor de $p < 0,05$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. MORFOMETRÍA

Es importante destacar que en ambos ensayos se produjeron muertes de algunos individuos (por causas que no pudieron ser determinadas) y fugas de algunos animales (particularmente por roturas generadas por los mismos animales en el material que formaba el techo). Es por esto que en el primer ensayo se tuvo una baja de 9 individuos en total (5 en el control y 4 en el grupo tratado), y en el segundo, fueron 16 individuos (8 en el control y 8 en el tratado), analizándose por lo tanto un total de 35 animales en el primer ensayo y de 44 en el segundo. La prueba de Rachas indicó la independencia de los datos analizados en cada recinto en ambos ensayos ($p > 0,210$). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre los parámetros morfométricos de los animales del grupo control y del grupo tratado al inicio del experimental, ($p > 0,05$; *T Student*), comprobando la distribución equitativa de los mismos. Al finalizar los experimentales, se calculó el crecimiento obtenido por los animales en cada recinto que sobrevivieron al periodo experimental tal como fuera mencionado previamente en la referencia del análisis estadístico realizado.

Los valores morfométricos de cada individuo que perduraron hasta el final del experimental y los promedios (\pm DE) correspondientes al primer ensayo se presentan en la Tabla 4.2 y del segundo ensayo en la Tabla 4.3. En ambos casos, el crecimiento en LHC y peso de los individuos durante el ensayo experimental (columna "Incremento") no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control ($p > 0,05$; *T Student*).

Tabla 4.2. LHC y Peso de los individuos del primer ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.

Nro	Nido	Recinto	Al inicio		Al final		Incremento	
			LHC (cm)	Peso (gr)	LHC (cm)	Peso (gr)	LHC (cm)	Peso (gr)
1	49	Control	15,40	131,10	27,30	1288,00	11,90	1156,90
2	49	Control	14,40	91,00	25,30	995,00	10,90	904,00
3	49	Control	14,00	95,30	26,90	1135,00	12,90	1039,70
4	49	Control	16,50	157,50	29,70	1221,00	13,20	1063,50
5	41	Control	14,50	89,60	14,90	670,00	0,40	580,40
6	15	Control	14,60	92,90	22,50	443,00	7,90	350,10
7	47	Control	17,00	159,70	21,00	397,00	4,00	237,30
8	15	Control	15,10	96,00	23,00	486,00	7,90	390,00
9	41	Control	15,70	120,20	25,90	676,00	10,20	555,80
10	41	Control	11,90	47,60	20,00	319,00	8,10	271,40
11	41	Control	18,20	195,00	27,50	850,00	9,30	655,00
12	47	Control	12,10	46,80	20,80	353,00	8,70	306,20
13	49	Control	12,50	56,80	16,70	106,00	4,20	49,20
14	41	Control	13,10	63,30	18,10	212,00	5,00	148,70
15	15	Control	22,50	385,00	26,50	735,00	4,00	350,00
16	15	Control	32,00	1285,00	33,00	1400,00	1,00	115,00
17	47	Control	34,00	1430,00	47,00	2120,00	13,00	690,00
			17,26	267,22	25,06	788,60	7,80	521,36 ±
		X ± DE	± 6,45	± 418,73	± 7,40	± 521,52	± 4,09	349,66
18	47	Tratado	19,10	233,00	29,00	1082,00	9,90	849,00
19	49	Tratado	14,80	114,60	27,00	1021,00	12,20	906,40
20	41	Tratado	18,50	228,00	27,40	830,00	8,90	602,00
21	49	Tratado	12,80	58,60	17,50	1024,00	4,70	965,40
22	47	Tratado	17,50	177,00	21,00	929,00	3,50	752,00
23	15	Tratado	18,00	180,00	26,50	863,00	8,50	683,00
24	49	Tratado	13,20	68,10	21,00	262,00	7,80	193,90
25	15	Tratado	15,70	120,20	24,00	584,00	8,30	463,80
26	47	Tratado	17,60	173,00	29,00	1000,00	11,40	827,00
27	15	Tratado	16,90	158,90	25,00	634,00	8,10	475,10
28	41	Tratado	15,60	113,20	20,50	344,00	4,90	230,80
29	49	Tratado	15,60	129,60	27,50	847,00	11,90	717,40
30	49	Tratado	13,30	63,60	23,80	549,00	10,50	485,40
31	41	Tratado	15,50	100,40	24,50	575,00	9,00	474,60
32	41	Tratado	16,50	134,50	26,40	805,00	9,90	670,50
33	47	Tratado	14,70	80,80	18,00	352,00	3,30	271,20
34	15	Tratado	15,20	105,90	23,00	559,00	7,80	453,10
35	47	Tratado	24,00	460,00	32,00	1610,00	8,00	1150,00
			16,36	150,00 ±	24,62 ±	770,60 ±	8,26 ±	620,59 ±
		X ± DE	±2,62	93,05	3,93	327,81	2,68	263,29

Nro: número; **LHC:** longitud hocico cloaca; **cm:** centímetros; **gr:** gramos; **X:** media; **DE:** desvío estándar

Tabla 4.3. LHC y Peso de los individuos del segundo ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.

Nro	Nido	Recinto	Al inicio		Al final		Incremento	
			LHC (cm)	Peso (gr)	LHC (cm)	Peso (gr)	LHC (cm)	Peso (gr)
1	30	control	9,90	25,40	16,00	151,00	6,10	125,60
2	19	control	10,50	29,60	17,90	213,00	7,40	183,40
3	30	control	12,50	58,20	18,00	207,00	5,50	148,80
4	18	control	15,00	109,20	21,90	420,00	6,90	310,80
5	18	control	13,20	70,50	18,60	235,00	5,40	164,50
6	39	control	11,30	33,10	16,50	168,00	5,20	134,90
7	59	control	13,50	68,70	23,50	519,00	10,00	450,30
8	18	control	12,80	55,40	21,50	344,00	8,70	288,60
9	19	control	11,80	39,90	20,00	289,00	8,20	249,10
10	19	control	12,90	53,10	17,50	156,00	4,60	102,90
11	18	control	11,50	41,20	20,50	295,00	9,00	253,80
12	18	control	10,60	30,50	17,30	164,00	6,70	133,50
13	39	control	15,70	121,10	25,20	696,00	9,50	574,90
14	59	control	12,20	44,10	19,30	258,00	7,10	213,90
15	39	control	11,70	48,70	17,70	203,00	6,00	154,30
16	59	control	13,40	70,20	20,00	255,00	6,60	184,80
17	30	control	9,60	33,50	17,20	157,00	7,60	123,50
18	30	control	14,20	81,00	19,00	192,00	4,80	111,00
19	19	control	10,80	34,20	16,60	176,00	5,80	141,80
20	22	control	11,00	36,60	16,00	102,00	5,00	65,40
21	18	control	12,00	44,70	17,00	174,00	5,00	129,30
22	19	control	10,20	26,90	15,00	104,00	4,80	77,10
			12,10	52,54 ±	18,74 ±	249,00	6,63	196,46 ±
		X ± DE	± 1,63	25,66	2,57	± 141,00	± 1,63	122,29
23	19	tratado	11,70	42,30	18,00	179,00	6,30	136,70
24	30	tratado	11,90	48,70	19,30	238,00	7,40	189,30
25	18	tratado	14,30	89,40	24,30	518,00	10,00	428,60
26	59	tratado	13,50	72,70	18,80	208,00	5,30	135,30
27	22	tratado	11,80	45,80	19,10	211,00	7,30	165,20
28	30	tratado	10,40	32,50	18,50	219,00	8,10	186,50
29	19	tratado	10,50	40,20	14,50	124,00	4,00	83,80
30	18	tratado	12,00	42,10	17,70	184,00	5,70	141,90
31	18	tratado	14,30	83,90	19,00	216,00	4,70	132,10
32	18	tratado	12,10	44,20	16,60	155,00	4,50	110,80
33	59	tratado	13,50	59,60	21,20	355,00	7,70	295,40
34	39	tratado	10,80	30,40	16,00	138,00	5,20	107,60
35	22	tratado	11,40	39,60	19,50	234,00	8,10	194,40
36	30	tratado	12,50	50,30	18,50	204,00	6,00	153,70
37	59	tratado	11,40	37,10	18,20	205,00	6,80	167,90
38	22	tratado	13,50	78,10	18,70	190,00	5,20	111,90
39	18	tratado	12,10	52,70	18,00	191,00	5,90	138,30
40	30	tratado	12,10	52,00	17,60	179,00	5,50	127,00
41	19	tratado	14,50	82,10	20,00	243,00	5,50	160,90
42	19	tratado	12,40	45,10	16,50	156,00	4,10	110,90
43	59	tratado	10,20	28,40	17,50	193,00	7,30	164,60
44	30	tratado	10,60	29,60	15,30	77,00	4,70	47,40
			12,16	51,22 ±	18,31 ±	209,86 ±	6,15	158,65 ±
		X ± DE	± 1,30	18,58	2,04	86,84	± 1,52	77,31

Nro: número; LHC: longitud hocico cloaca; cm: centímetros; gr: gramos; X: media; DE: desvío estándar

4.3.2. GENOTOXICIDAD

El test de Rachas demostró la independencia de los datos de cada recinto para casi todas las variables de genotoxicidad analizadas en ambos ensayos ($p > 0,05$), excepto el caso de los eritrocitos

binucleados en el grupo control del primer ensayo ($p=0,043$) y las ANT también del grupo control en el segundo ensayo ($p=0,041$). Los valores de las frecuencias de MN y AN e ID de cada individuo y los promedios (\pm DE) correspondientes al primer ensayo se presentan en la Tabla 4.4 y del segundo ensayo en la Tabla 4.5.

Tabla 4.4. Valores individuales y medias (\pm DE) de genotoxicidad en el primer ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.

Nro	Recinto	MN	BN	NM	NI	NE	EritA	ANT	ID
1	Control	2,00	2,00	1,00	0,00	8,00	0,00	11,00	104,00
2	Control	0,00	4,00	4,00	1,00	4,00	3,00	16,00	104,00
3	Control	1,00	2,00	4,00	4,00	4,00	0,00	14,00	104,00
4	Control	0,00	9,00	2,00	4,00	0,00	0,00	15,00	106,00
5	Control	0,00	0,00	3,00	1,00	3,00	0,00	7,00	100,00
6	Control	0,00	5,00	9,00	10,00	0,00	0,00	24,00	104,00
7	Control	0,00	9,00	7,00	22,00	0,00	0,00	38,00	111,00
8	Control	0,00	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	3,00	104,00
9	Control	1,00	2,00	1,00	1,00	4,00	1,00	9,00	104,00
10	Control	1,00	5,00	2,00	0,00	3,00	0,00	10,00	117,00
11	Control	1,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	3,00	105,00
12	Control	1,00	4,00	1,00	0,00	5,00	0,00	10,00	107,00
13	Control	0,00	3,00	1,00	1,00	2,00	0,00	7,00	103,00
14	Control	1,00	4,00	4,00	0,00	4,00	0,00	12,00	100,00
15	Control	2,00	9,00	10,00	10,00	4,00	1,00	34,00	142,00
16	Control	0,00	2,00	3,00	4,00	3,00	0,00	12,00	119,00
17	Control	1,00	6,00	16,00	24,00	6,00	0,00	52,00	113,00
	X \pm DE	0,65\pm 0,70	4,00 \pm 2,89	4,12\pm 4,16	4,94\pm 7,50	2,94\pm 2,36	0,29\pm 0,77	16,29\pm 13,34	108,65 \pm 10,15
18	Tratado	1,00	0,00	12,00	13,00	0,00	0,00	25,00	107,00
19	Tratado	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100,00
20	Tratado	5,00	2,00	2,00	0,00	2,00	0,00	6,00	127,00
21	Tratado	7,00	2,00	1,00	3,00	5,00	1,00	12,00	100,00
22	Tratado	0,00	4,00	1,00	4,00	2,00	0,00	11,00	107,00
23	Tratado	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	2,00	117,00
24	Tratado	4,00	1,00	3,00	0,00	5,00	0,00	9,00	133,00
25	Tratado	3,00	2,00	4,00	4,00	0,00	0,00	10,00	103,00
26	Tratado	2,00	10,00	5,00	18,00	0,00	0,00	33,00	100,00
27	Tratado	1,00	5,00	7,00	0,00	1,00	0,00	13,00	150,00
28	Tratado	2,00	7,00	3,00	24,00	4,00	0,00	38,00	130,00
29	Tratado	2,00	5,00	2,00	4,00	2,00	0,00	13,00	118,00
30	Tratado	2,00	1,00	2,00	16,00	7,00	0,00	26,00	133,00
31	Tratado	1,00	2,00	4,00	10,00	8,00	0,00	24,00	135,00
32	Tratado	2,00	5,00	4,00	33,00	1,00	0,00	43,00	130,00
33	Tratado	1,00	3,00	6,00	4,00	8,00	1,00	22,00	124,00
34	Tratado	0,00	1,00	1,00	18,00	0,00	0,00	20,00	136,00
35	Tratado	1,00	10,00	7,00	6,00	1,00	0,00	24,00	118,00
	X \pm DE	1,94\pm 1,83	3,39\pm 3,09	3,61\pm 2,97	8,72\pm 9,63	2,61\pm 2,83	0,11\pm 0,32	18,44\pm 11,93	120,44\pm 15,00

Nro: número; **MN:** micronúcleo; **BN:** brote nuclear; **NM:** núcleo con muesca; **NI:** núcleo irregular; **NE:** núcleo excéntrico; **EritA:** eritrocito anucleado; **ANT:** anomalías nucleares totales (sumatoria de categorías); **ID:** índice de daño. **X:** media; **DE:** desvío estándar

Tabla 4.5. Valores individuales y medias (\pm DE) de genotoxicidad en el segundo ensayo de exposición semi-controlada a plaguicidas.

Nr o	Recint o	Nido	MN	BN	NM	NI	NE	EritA	ANT	ID
1	control	30	3,00	5,00	1,00	0,00	2,00	1,00	9,00	103,00
2	control	19	0,00	4,00	2,00	0,00	3,00	1,00	10,00	128,00
3	control	30	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	109,00
4	control	18	1,00	1,00	0,00	4,00	4,00	0,00	9,00	103,00
5	control	18	0,00	14,00	1,00	0,00	4,00	0,00	19,00	105,00
6	control	39	0,00	4,00	2,00	2,00	5,00	0,00	13,00	107,00
7	control	59	1,00	3,00	0,00	0,00	2,00	0,00	5,00	105,00
8	control	18	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	119,00
9	control	19	0,00	1,00	0,00	0,00	3,00	0,00	4,00	103,00
10	control	19	0,00	3,00	1,00	1,00	3,00	2,00	10,00	106,00
11	control	18	0,00	1,00	0,00	0,00	2,00	0,00	3,00	107,00
12	control	18	1,00	1,00	1,00	0,00	4,00	0,00	6,00	111,00
13	control	39	0,00	0,00	0,00	4,00	1,00	0,00	5,00	106,00
14	control	59	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	108,00
15	control	39	0,00	5,00	4,00	12,00	1,00	0,00	22,00	107,00
16	control	59	0,00	6,00	10,00	9,00	1,00	0,00	26,00	116,00
17	control	30	0,00	6,00	6,00	6,00	0,00	0,00	18,00	105,00
18	control	30	0,00	1,00	0,00	0,00	6,00	0,00	7,00	107,00
19	control	19	3,00	5,00	1,00	0,00	2,00	1,00	9,00	103,00
20	control	22	0,00	4,00	2,00	0,00	3,00	1,00	10,00	128,00
21	control	18	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	109,00
22	control	19	1,00	1,00	0,00	4,00	4,00	0,00	9,00	103,00
	X \pm DE		0,64 \pm 0,90	3,13 \pm 3,15	2,82 \pm 2,44	3,45 \pm 3,34	2,14 \pm 1,77	0,27 \pm 0,58	12,00 \pm 6,87	108,50 \pm 7,36
23	tratado	19	4,00	8,00	7,00	1,00	5,00	0,00	21,00	133,00
24	tratado	30	4,00	12,00	8,00	10,00	1,00	1,00	32,00	142,00
25	tratado	18	1,00	2,00	6,00	12,00	2,00	1,00	23,00	155,00
26	tratado	59	1,00	3,00	0,00	4,00	7,00	0,00	14,00	123,00
27	tratado	22	1,00	3,00	1,00	4,00	0,00	1,00	9,00	125,00
28	tratado	30	3,00	10,00	6,00	18,00	1,00	0,00	35,00	118,00
29	tratado	19	4,00	8,00	6,00	6,00	1,00	0,00	21,00	144,00
30	tratado	18	1,00	8,00	6,00	0,00	0,00	0,00	14,00	130,00
31	tratado	18	4,00	11,00	17,00	24,00	2,00	0,00	54,00	138,00
32	tratado	18	1,00	7,00	4,00	6,00	3,00	0,00	20,00	170,00
33	tratado	59	3,00	5,00	7,00	0,00	0,00	0,00	12,00	122,00
34	tratado	39	1,00	1,00	2,00	4,00	2,00	0,00	9,00	126,00
35	tratado	22	4,00	5,00	12,00	4,00	3,00	0,00	24,00	120,00
36	tratado	30	1,00	3,00	6,00	6,00	3,00	0,00	18,00	136,00
37	tratado	59	3,00	12,00	12,00	14,00	0,00	0,00	38,00	134,00
38	tratado	22	2,00	40,00	18,00	57,00	3,00	0,00	118,00	119,00
39	tratado	18	1,00	3,00	4,00	0,00	2,00	0,00	9,00	163,00
40	tratado	30	3,00	5,00	4,00	0,00	1,00	0,00	10,00	120,00
41	tratado	19	1,00	4,00	4,00	0,00	1,00	0,00	9,00	129,00
42	tratado	19	4,00	18,00	21,00	24,00	0,00	0,00	63,00	130,00
43	tratado	59	2,00	10,00	7,00	8,00	3,00	1,00	29,00	139,00
44	tratado	30	1,00	4,00	10,00	12,00	1,00	0,00	27,00	118,00
	X \pm DE		2,27 \pm 1,31	8,27 \pm 8,21	7,64 \pm 5,43	9,73 \pm 12,84	1,86 \pm 1,75	0,18 \pm 0,39	27,68 \pm 24,77	133,36 \pm 14,43

Nro: número; **MN:** micronúcleo; **BN:** brote nuclear; **NM:** núcleo con muesca; **NI:** núcleo irregular; **NE:** núcleo excéntrico; **EritA:** eritrocito anucleado; **ANT:** anomalías nucleares totales (sumatoria de categorías); **ID:** índice de daño; **X:** media; **DE:** desvío estándar.

En ambos ensayos, se evidenció un incremento estadísticamente significativo en el grupo tratado respecto del control, tanto en el ID ($p=0,032$ y $p< 0,001$, respectivamente; Fig. 4.2) como en la FMN ($p=0,011$ y $p< 0,001$, respectivamente; Fig. 4.3).

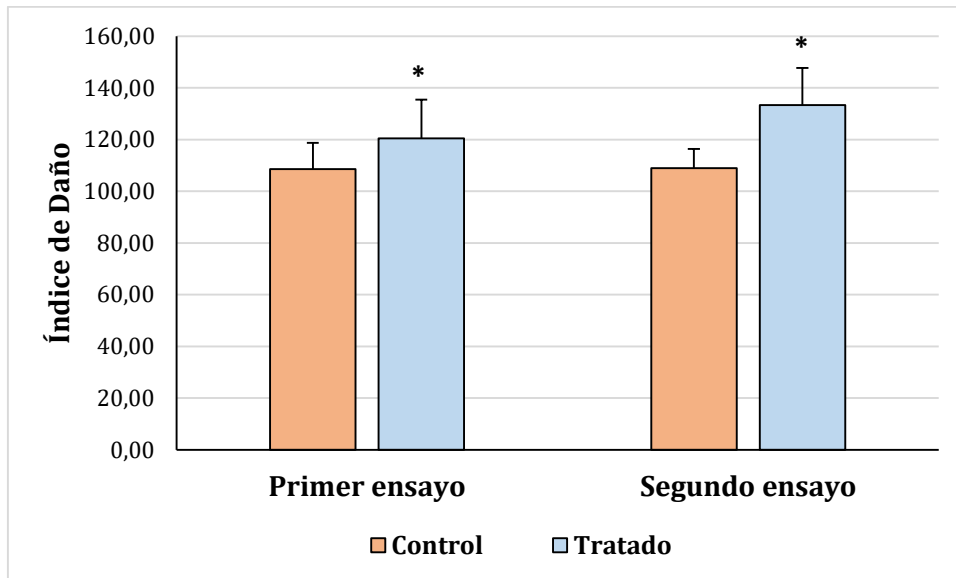


Figura 4.2. Comparación del Índice de daño (media \pm DE) generado en las dos instancias de experimentación semi-controlada. * Diferencia estadísticamente significativa respecto del control en el primer y segundo ensayo ($p<0,05$; *Test de Mann Whitney*).

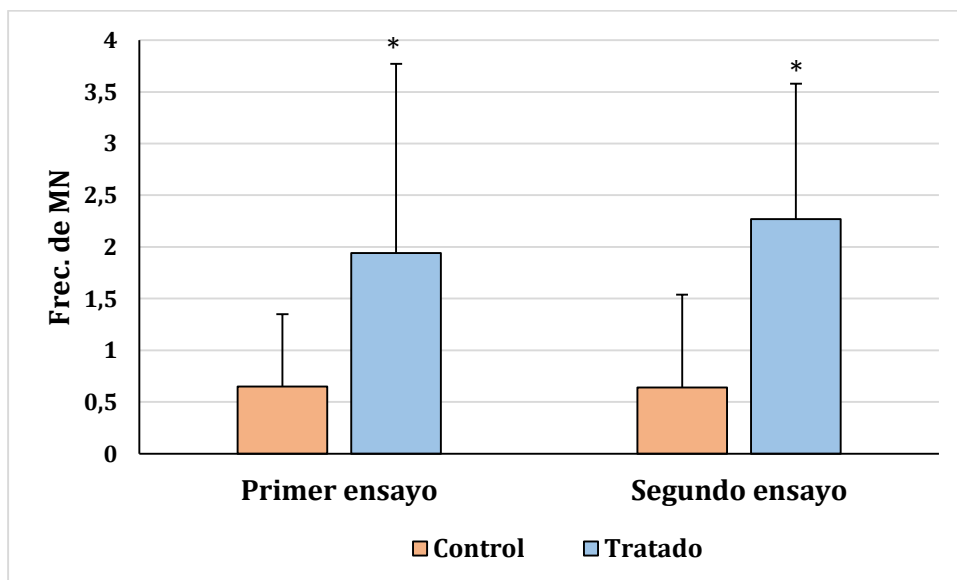


Figura 4.3. Comparación de la frecuencia de MN (media \pm DE) generado en las dos instancias de experimentación semi-controlada. * Diferencia estadísticamente significativa respecto del control en primer y segundo ensayo ($p<0,05$; *Test de Mann Whitney*).

En el primer ensayo, las diferentes categorías y AN totales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control ($p > 0,05$; *T Student*). Por el contrario, en el segundo ensayo se observaron incrementos estadísticamente significativos entre el grupo tratado en los valores de BN ($p=0,011$), NM ($p=0,002$), NI ($p=0,042$) y AN totales ($p=0,009$), respecto del control (Figura 4.4).

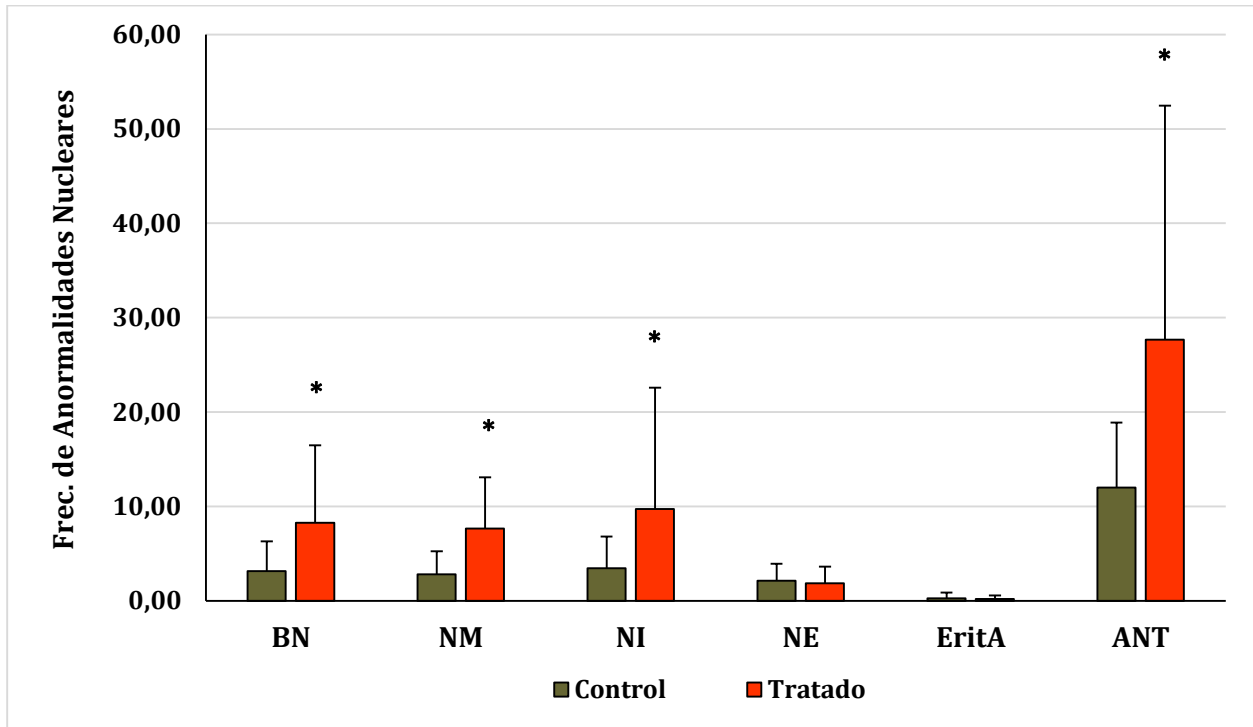


Figura 4.4. Frecuencias de AN (media \pm DE) en eritrocitos de *S. merianae* obtenidos en el segundo ensayo de exposición semi-controlada a agroquímicos. BN: brote nuclear; NM: núcleo con muesca; NI: núcleo irregular; NE: núcleo excéntrico; EritA: eritrocito anucleado; ANT: anomalías nucleares totales. *Diferencia estadísticamente significativa respecto del control ($p < 0,05$; *T Student*).

Respecto al nido de origen, en ninguno de los ensayos realizados se encontró influencia del nido sobre los resultados de genotoxicidad medidos por los tres biomarcadores ($p > 0,05$; ANOVA-*Tukey*), en el Peso o en la LHC ($p > 0,05$; ANOVA-*Tukey*). Tampoco se observó relación alguna entre los parámetros morfométricos y los biomarcadores de genotoxicidad utilizados ($p > 0,05$ en todos los casos, RLS).

4.4. DISCUSIÓN

Actualmente, el uso mundial de los plaguicidas en la agricultura, jardinería, salud pública para la prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, y la manipulación durante la fabricación de estos químicos implica que todos los seres vivos estamos expuestos continuamente a múltiples plaguicidas, ya sea en forma individual o bien a mezclas de estos. El impacto de las mezclas de plaguicidas en los organismos no blanco, que frecuentemente ocurre a bajas dosis y a largo plazo, puede generar múltiples interacciones entre los componentes químicos, generando un desafío muy complejo para la evaluación del riesgo que estas exposiciones conllevan. Como dificultad adicional cabe destacar el número y la composición de las posibles mezclas que a menudo se desconocen y se modifican con el tiempo, sumado a que el mecanismo preciso de toxicidad de numerosos pesticidas aún hoy se desconoce (Hernández *et al.*, 2017). Dado el uso generalizado en la agricultura de la CIP y el GLIF y la alta persistencia ambiental del ENDO, es probable que estos plaguicidas puedan coexistir por mucho tiempo en los agroecosistemas, afectando y alterando poblaciones de distintas especies que allí frecuentan o habitan (Svartz *et al.*, 2016), entre ellos las de los reptiles.

En el presente capítulo queda demostrado que la exposición subcrónica de nuestro modelo biológico reptiliano a la mezcla de concentraciones subletales de las formulaciones de RU, CIP y ENDO, en un escenario de simulación seminatural, indujo un incremento significativo en el daño genotóxico en comparación con las iguanas del grupo control, evidenciado por todos los biomarcadores analizados a este nivel. El daño en el ADN detectado por EC y Ensayo de MN en el grupo expuesto del primer ensayo realizado (ID= 120,44 ± 15,00; FMN= 1,94 ± 1,83) fue similar al del segundo (ID= 133,36 ± 14,43; MN= 2,27 ± 1,31) y, por tanto, comparables. En cambio, las AN sólo mostraron incrementos significativos en la frecuencia de BN, NM, NI y ANT en animales expuestos a la mezcla durante el segundo ensayo. Resultados similares encontramos en nuestro estudio previo de exposición de embriones de iguana a la mezcla de estos plaguicidas en condiciones controladas de laboratorio (Capítulo III). En relación a otros trabajos publicados previamente y con otros organismos, López González *et al.* (2019) observaron incrementos significativos en la frecuencia de

MN, BN y NM en eritrocitos de yacaré overo expuestos *in vivo* a mezclas binarias de formulaciones de CIP con GLIF y clorpirifós, mientras que la mezcla de GLIF y clorpirifós mostró un efecto antagónico que suprime el efecto genotóxico de los compuestos por separado, observado en estudios previos bajo condiciones similares y a las mismas concentraciones (Poletta *et al.*, 2017). Además, se había comprobado también genotoxicidad de la mezcla de los tres compuestos. Los autores indicaron que la presencia de la CIP es determinante para la toxicidad de estas mezclas, ya que su presencia en la mezcla ternaria anula el efecto antagónico observado entre GLIF-clorpirifós. Sin embargo, la CIP no incrementa la toxicidad de las mezclas binarias, ya que el efecto observado en estas es similar al reportado previamente para las formulaciones en forma separada (López González *et al.*, 2019). En nuestro caso, es difícil inferir qué compuesto pudo haber sido el responsable del daño genotóxico en los juveniles de iguana debido que no hemos probado la toxicidad de los compuestos individuales bajo estas condiciones experimentales, por ende, tampoco podemos inferir qué tipo de interacción ocurrió en la mezcla ensayada en estos grupos de animales juveniles. En otro estudio realizado en peces del género *Astyanax* que provenían de áreas potencialmente contaminadas con mezclas de plaguicidas, entre ellos RU, reportaron genotoxicidad incrementada en los organismos expuestos (Ramsdorf *et al.*, 2012). En la especie *Oreochromis niloticus* se observó un nivel de daño al ADN significativo en eritrocitos luego de la exposición *in vivo* durante 70 días a la mezcla de ENDO y clorpirifós (Ambreen y Javed, 2018). En juveniles del pez *Clarias gariepinus* reportan un aumento de MN en los eritrocitos de los organismos expuestos a la mezcla de concentraciones subletales de ENDO y deltametrina (Mumuni y Sogbanmu, 2018). En trabajadores agrícolas expuestos a una mezcla compleja de plaguicidas se describió una tendencia a aumentar la frecuencia de MN y Brotes nucleares (Kahl *et al.*, 2016; Benedetti *et al.*, 2018). Esto está asociado a que las anomalías en la morfología de los núcleos celulares han sido interpretadas como lesiones análogas a los MN, debido a que las AN pueden preceder a la formación de los MN en el proceso de eliminación del material genético dañado. Sin embargo, se debe comentar que en otros estudios los valores de las ANT (sumatoria de 4 figuras: NM, BN, binucleada y núcleo lobulado) no se correlacionan directamente con la frecuencia de MN para *Odontophrynus cordobae* (Pollo *et al.*, 2019).

En función de los hallazgos antes mencionados, resulta importante recordar que a la hora de evaluar la toxicidad de mezclas químicas se pueden considerar dos enfoques diferentes: probar la mezcla completa o probar los componentes individuales de la mezcla. Por lo general, la evaluación de efectos de la mezcla completa se aplica con frecuencia para muestras ambientales, ya que tiene la ventaja de evaluar la toxicidad de las mezclas tal como se aplican en los ambientes naturales, incluso cuando no se conocen todos los componentes de la misma (Kienzler *et al.*, 2016). Nuestros resultados en este capítulo corresponden a la evaluación de la mezcla de plaguicidas ya mencionados, debido a que el objetivo de los ensayos era simular las condiciones de exposición ambiental de poblaciones naturales de iguana overa, donde no se practican frecuentemente exposiciones con agentes químicos individuales. Diferentes estudios han comparado los efectos genotóxicos inducidos por los compuestos individuales y su mezcla, y comprobaron que esta última generaba mayor toxicidad (Mai *et al.*, 2018). Para predecir la respuesta toxicológica a una mezcla de sustancias químicas, en la literatura definen tres tipos básicos de acción: (a) adición de concentración (AC) que implica un modo de acción (MA) similar al de las sustancias presentes en la mezcla, es decir que actúan en el mismo sitio objetivo molecular; (b) acción independiente o adición de respuestas, supone un MA diferente de las sustancias involucradas, causando un efecto biológico integral común; y (c) interacciones entre sustancias en la mezcla (Verro *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2017). Los dos primeros conceptos (a y b) corresponden a modelos aditivos que se basan en el supuesto de que la toxicidad de una sustancia no influye en la toxicidad de otra sustancia presente en la mezcla, es decir, que ambos componentes químicos no interactúan entre sí, ni a nivel fisicoquímico ni en su toxicocinética y toxicodinámica (Bopp *et al.*, 2015). Las interacciones, en cambio, representan situaciones en las que algunos o todos los componentes individuales de una mezcla influyen en la toxicidad de los demás y los efectos conjuntos pueden desviarse de las predicciones aditivas. En función de las interacciones, la toxicidad combinada por acción de múltiples plaguicidas puede clasificarse como menos que aditivo (antagonismo) o mayor que aditivo (sinergia), según los efectos de los componentes de la mezcla (Cedergreen, 2014; Hernández *et al.*, 2017). El “efecto sinérgico” ocurre cuando cada compuesto individual presenta una toxicidad determinada y combinados en una

mezcla generan una toxicidad mayor de lo esperado. Ejemplos de este tipo se pusieron en evidencia ante la mezcla de concentraciones subletales de formulaciones comerciales a base de GLIF y dicamba (Soloneski *et al.*, 2016), y de ENDO y CIP (Svartz *et al.*, 2016a) en *Rhinella arenarum*. Por su parte, el “efecto potenciador” es un tipo especial de sinergia que ocurre cuando un componente que no ejerce efecto tóxico en un órgano aumenta el efecto tóxico de otros compuestos en dicho órgano. Finalmente, el “efecto antagonista” ocurre cuando el efecto combinado de la mezcla es menor de lo esperado al considerar el efecto aditivo total de los componentes individuales. Este tipo de efecto se observó en la mezcla binaria de formulaciones de ENDO y propenofos en linfocitos de sangre periférica humana *in vitro* (Sultana Shaik *et al.*, 2016) y entre formulaciones de GLIF y clorpirifos en mezcla binaria en eritrocitos de *Caiman latirostris* (López González *et al.*, 2019). Cabe aclarar que estas interacciones pueden cambiar en los mismos organismos al ser expuestos en distintas etapas del desarrollo o aumentar el tiempo de exposición de sub-crónico a crónico (Svartz *et al.*, 2016a). En torno a esto, la respuesta de los organismos a las combinaciones de sustancias tóxicas depende de múltiples factores y todos los esfuerzos están dirigidos a neutralizar o minimizar los efectos nocivos en el organismo mediante vías metabólicas de biotransformación, conjugación, aislamiento y/o excreción al entorno (Lushchak *et al.*, 2018).

En relación a nuestros resultados sobre el peso de las iguanas, observamos que los animales de ambos recintos mostraron un patrón típico de crecimiento para la especie, caracterizado por un rápido crecimiento de acuerdo a la etapa juvenil y sin diferencias entre los grupos (Tratado vs Control). Esto indicaría que la exposición a la mezcla de plaguicidas no afectó significativamente el metabolismo de los animales, permitiéndonos inferir que las concentraciones aplicadas dentro del recinto o el tiempo de exposición, no fueron suficientes para generar un impacto negativo en el crecimiento de los animales, resultado de un desequilibrio en los procesos bioenergéticos subyacentes que involucran la asimilación de energía y el gasto metabólico (Amaral *et al.*, 2012b). Estos procesos pueden verse afectados directamente por los contaminantes, pero también pueden ser modificados indirectamente por otros factores, y los mecanismos responsables de la reducción de tamaño pueden no ser evidentes en forma inmediata (López González *et al.*, 2019). Es posible

también que las iguanas hayan tenido una metabolización rápida de los plaguicidas debido a las altas temperaturas durante los días posteriores a las fumigaciones. A diferencia de nuestros resultados, Mestre *et al.* (2019) observaron un crecimiento reducido y efectos de inmunosupresión en iguanas overas expuestas a la mezcla de plaguicidas en iguales condiciones de exposición semi-natural y durante el mismo tiempo. Los autores consideran que los organismos invirtieron menos energía en la masa corporal para mantener activas sus defensas inmunológicas contra estos químicos. En subpoblaciones de lagartos *Podarcis bocagei* expuestos a mezclas de plaguicidas también se observó una disminución significativa en el índice de condición corporal, y un pequeño aumento en la tasa metabólica estándar (Amaral *et al.*, 2012b). No obstante, otro estudio realizado por los mismos investigadores y en la misma especie en un mesocosmo reveló un mayor tamaño corporal en los lagartos expuestos que en los controles, considerado como un efecto indirecto de la acción de los plaguicidas. Los autores sugieren que los insecticidas aplicados pudieron haber debilitado las presas silvestres que se acercaban a los recintos y, de esta manera, contribuir al aumento de la comida disponible para los lagartos, alterándose así la cadena nutritiva a favor de la dieta del reptil (Amaral *et al.*, 2012c). Por su parte, Barraco (2015) observó un mayor tamaño corporal en iguanas overas que habitaban en áreas perturbadas (agrícolas) comparado con las de áreas no perturbadas (áreas naturales), asociado a una dieta diferente. Los ambientes agrícolas parecían tener presas con mayor contenido calórico. Estas diferencias en los resultados entre distintos tipos de estudios podrían interpretarse como cambios en las estrategias fisiológicas de la especie acorde a las condiciones nuevas que se generan como consecuencia de las perturbaciones ambientales (Mestre *et al.*, 2019). Es decir, que los lagartos son capaces de hacer frente a niveles de exposición variados, compensándolos mediante una adaptación progresiva a las nuevas condiciones ambientales, ya sea por un aumento en el consumo de alimentos o por una disminución de la energía disponible para el crecimiento, el almacenamiento o la reproducción (Amaral *et al.*, 2012c; Bicho *et al.*, 2013; Barraco, 2015). En relación a todo lo antes tratado, la exposición a los plaguicidas, fundamentalmente en la forma de mezclas, representa un alto riesgo para los organismos no blanco, no solo a través de la cadena alimenticia en el contexto ecológico sino también por otro tipo de consecuencias orgánicas

generadas a largo plazo que pueden afectar la supervivencia de las poblaciones expuestas (Jha, 1998).

Los resultados descritos en este capítulo, al igual que en los anteriores, ponen en evidencia que el uso de los plaguicidas bajo las condiciones evaluadas afectó al material genético en los organismos juveniles de la iguana overa. Por lo tanto, la mezcla de plaguicidas evaluada en esta instancia, tal como se aplica en las prácticas agrícolas de nuestra región, constituye para estos reptiles en particular y, probablemente, para los organismos en general, una amenaza a la integridad de los individuos expuestos. En este sentido, los biomarcadores genéticos resultaron de gran importancia como sistemas de alerta temprana, ya que fueron capaces de evidenciar las alteraciones. Desde una perspectiva más amplia como es la ecotoxicológica, es fundamental la identificación de las posibles consecuencias toxicológicas antes de que las poblaciones se vean seriamente afectadas, a corto o largo plazo, particularmente cuando las exposiciones son reiteradas y no contemplan tiempos ni condiciones para la recuperación de los individuos.



CAPÍTULO V:

**Biomonitoreo de adultos y
neonatos de *Salvator
merianae* expuestos
ambientalmente a
plaguicidas**



5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. REPTILES Y EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS

La contaminación ambiental y la pérdida de hábitat se describen como causas subyacentes de la disminución de la biodiversidad en distintos ecosistemas, con mayor énfasis en áreas agrícolas (Mingo *et al.*, 2017). El escenario más frecuente que se observa en estos ecosistemas lo constituyen las reiteradas fumigaciones que, constantemente, exponen a la biodiversidad a mezclas de plaguicidas. Por su actividad biocida, escala y volumen de aplicación, los plaguicidas están hoy considerados como el mayor contaminante de esos ambientes terrestres. Varios plaguicidas fueron clasificados como posibles carcinógenos y probablemente teratógenos por la IARC, OMS, en humanos (Gómez-Arroyo *et al.*, 2013), debido a que tienen la capacidad de interactuar con el material genético, resultando en mutaciones asociadas a la inestabilidad genómica y daño genómico no reversible (Martínez-Valenzuela *et al.*, 2017). Los estudios de biomonitoreo organizados adecuadamente en una batería de ensayos que analicen mutagenicidad pueden evaluar el riesgo genotóxico durante una exposición definida, a corto, mediano y largo plazo (Martínez-Valenzuela *et al.*, 2017). En este tipo de estudios, las especies silvestres nativas son fundamentales dado que pueden reflejar el estado de salud de los ambientes. La literatura sobre el tema muestra que una amplia mayoría de los biomonitoreos se han realizado en peces (Lanfranchi *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2018; Iturburu, Simoniello, *et al.*, 2018), anfibios (Attademo *et al.*, 2014; Lajmanovich *et al.*, 2014, 2018; Curi *et al.*, 2017), aves (Martínez-López *et al.*, 2015; Quero *et al.*, 2016, 2019) y mamíferos (Zúñiga-González *et al.*, 2000, 2001; Luaces *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2018), dejando en minoría al grupo de los reptiles terrestres. En los últimos años han surgido nuevos estudios que evidencian que los reptiles estuvieron y están en contacto con los plaguicidas en su ámbito de distribución natural y manifiestan efectos nocivos en la salud de los individuos, si se los analiza con métodos específicos de detección, por lo cual son considerados como especies centinelas (Cristaldi *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2010, 2013; Stewart *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2012a; Latorre *et al.*, 2013; Douros *et al.*, 2015; Carpenter *et al.*, 2016; Schaumburg *et al.*, 2016). En este grupo de vertebrados, el biomonitoreo se ha centrado

primariamente en especies del Orden Testudines y Crocodylia (Zúñiga-González *et al.*, 2000; Matson *et al.*, 2005; Milnes y Guillette, 2008; Poletta *et al.*, 2012; Arukwe *et al.*, 2016; Zapata *et al.*, 2016; Poletta y Siroski, 2019), a pesar de que el Orden Squamata es el que engloba la mayor cantidad de especies reptilianas (Uetz *et al.*, 2016). Esto denota una cierta disparidad en el estudio del efecto no deseado en las diferentes especies dentro del mismo grupo de vertebrados. Si nos centramos en el monitoreo genotóxico de los Squamata, los lagartos son los preferidos y las especies del género *Podarcis* están en el primer lugar (Capriglione *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2012a; Mingo *et al.*, 2017). Aun considerando estos antecedentes de los últimos diez años o más, hasta el presente, en lo que hace a nuestro conocimiento, las directrices de entidades regulatorias como la OECD (OECD, 2017) no han contemplado la inclusión de los reptiles en las evaluaciones de riesgo ambiental. Una entidad que si lo ha incorporado es la “European Food Safety Authority” (EFSA), en su guía presentada en septiembre de 2016 (<https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/wgamphibian.pdf>). Los escasos datos de toxicidad presentes en la literatura hacen que sea muy difícil la comparación de la sensibilidad toxicológica entre diferentes especies de reptiles, así como en las distintas etapas de la vida (Ockleford *et al.*, 2018).

Los reptiles en su conjunto se consideran un grupo vulnerable a la acumulación de contaminantes debido a sus características fisiológicas y ecológicas tales como la longevidad, metabolismo basal bajo, madurez sexual tardía y comportamiento depredador, sólo por citar algunos caracteres. La contaminación ambiental por acción de los plaguicidas puede afectar a las especies silvestres dependiendo del estado de salud y la sensibilidad de los organismos, y en función del modo de exposición, absorción y metabolización de esas sustancias en los mismos (Gaikwad *et al.*, 2015). En el caso de los reptiles, la exposición puede ocurrir a través de diferentes vías, entre ellas la ingesta de alimentos como tierra, vegetación o insectos contaminados (Sanchez-Bayo y Hyne, 2011), la transferencia materna a los huevos (Rauschenberger *et al.*, 2004b, 2007; Stewart *et al.*, 2011) o la absorción ambiental por parte de los huevos (de Solla y Martin, 2011; de Solla, 2016). En la exposición por la dieta, las características corporales tienen un importante protagonismo, ya que las especies con índices corporales pequeños pueden estar más expuestos que los individuos de especies

más grandes (Weir *et al.*, 2010). Otra particularidad es la vía de exposición o las propiedades químico-físicas de la cubierta del cuerpo. La vía dérmica de exposición fue observada en los reptiles escamosos (Hopkins, 2006; Amaral *et al.*, 2012a), si bien hay autores que toman en cuenta que la misma depende de la composición de lípidos y de queratinocitos del tegumento (Palmer, 2000; Toni *et al.*, 2007). Wagner *et al.* (2015) consideran que los aspectos de la historia de vida de la especie también juegan un papel muy importante en la exposición y absorción de plaguicidas en los reptiles. Muchas especies reptilianas muestran fidelidad al lugar donde habitan, con nichos geográficos acotados (en inglés, *homerange*) y bajas tasas de migración. Así, la capacidad de estos animales para alejarse de áreas de exposición a plaguicidas se ve imposibilitada (Wagner *et al.*, 2015). Se ha descrito que los reptiles podrían ser más sensibles que los vertebrados homeotermos a ciertos plaguicidas, debido a su sistema de enzimas monooxigenasas más simple y su baja tasa metabólica, que pueden dificultar la capacidad de detoxificar estos compuestos. (Pauli *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2016). En base a esto, es importante mencionar que hasta la realización del presente trabajo de Tesis se carecía de información sobre la especie *S. merianae*, tanto a nivel genotóxico como de biomonitoreo. El objetivo de este capítulo se centró en reportar la evaluación de daño genotóxico realizada en ejemplares de *S. merianae* que habitan en sitios potencialmente contaminados con mezclas de plaguicidas dada su cercanía con cultivos de soja y de otros ejemplares de la misma especie reptiliana propia de sitios alejados de fuentes de contaminación agrícola u otra aparente, dentro de la provincia de Santa Fe. La información obtenida a más de ser original, cobra una gran importancia ya que aporta conocimientos específicos sobre esta especie, considerando su reconocido papel para la economía regional santafesina (Fitzgerald *et al.*, 1994; Porini, 2006), así como para los ecosistemas de los que forma parte (Winck, 2007; Vieira, 2016).

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. MUESTREOS

La temporada reproductiva de la iguana overa comienza a fines de octubre o principios de noviembre y finaliza en enero-febrero con la eclosión de los neonatos. En este periodo, el macho y la hembra permanecen juntos en la cueva, situación que sólo tiene lugar al principio de cada temporada reproductiva con el fin de aparearse. En función de esto, los muestreos de adultos (machos y/o hembras) se realizaron en el mes de diciembre en dos años consecutivos, 2013 y 2014, en distintas cuevas que fueron localizadas previamente, cuando se recorrió la región para determinar si formaba parte del hábitat de la especie. En la mayoría de los casos, sólo se encontró la hembra cuidando de los huevos. En otros casos, la cueva contenía los huevos en incubación sin la presencia de la hembra que, a suponer por la hora de muestreo, habría estado alimentándose. En unos pocos casos, se obtuvieron muestras de ambos parentales, eventos asociados a un muestreo realizado en un día fresco y lluvioso.

5.2.1.1. Áreas de muestreo

Los animales adultos y huevos de *S. merianae* que se muestrearon provenían de dos zonas distintas respecto a la aplicación de los plaguicidas, una zona expuesta y otra no expuesta, considerada como control. En la zona expuesta, los animales muestreados estaban en cuevas ubicadas en los bordes de parcelas cultivadas con soja, donde generalmente la entrada a las mismas se encontraba a una distancia aproximada de dos metros o menos, de la primera línea de soja sembrada (Fig. 5.1)



Figura 5.1. Localización de una cueva de iguana overa en el borde un cultivo de soja. El círculo rojo indica la entrada a la cueva en la base de un árbol de la especie paraíso (*Melia azedarach*), a 2 m de distancia de la primera línea de soja sembrada. Barra= 40 cm.

En la zona considerada como “control” se muestrearon iguanas presentes en cuevas que se ubicaban a una distancia mínima de 1000 (mil) metros de las parcelas cultivadas. Esta distancia se consideró adecuada teniendo en cuenta que la ley de fitosanitarios N° 11.273 vigente desde 1995 en la provincia de Santa Fe prohíbe las aplicaciones terrestres de plaguicidas de clase toxicológica C o D (equivalente a clase II-producto moderadamente tóxico y III-producto poco peligroso, respectivamente) dentro de un área mayor a 500 metros a la redonda desde las parcelas cultivadas (Ley de fitosanitarios N° 11.273, 1995).

La mayoría de las cuevas o madrigueras en la zona expuesta estaban ubicadas en las localidades de Sa Pereira y sus alrededores, Nuevo Torino (Dpto. Las Colonias), y Reconquista (Dpto. Gral Obligado) de la provincia de Santa Fe. Mientras que las cuevas o madrigueras de la zona no expuesta estaban ubicadas en la localidad de San Cristóbal (Dpto. San Cristóbal) y en sitios cercanos a la localidad de Sa Pereira y Nuevo Torino (Dpto. Las Colonias) de la provincia de Santa Fe (Fig. 5.2).

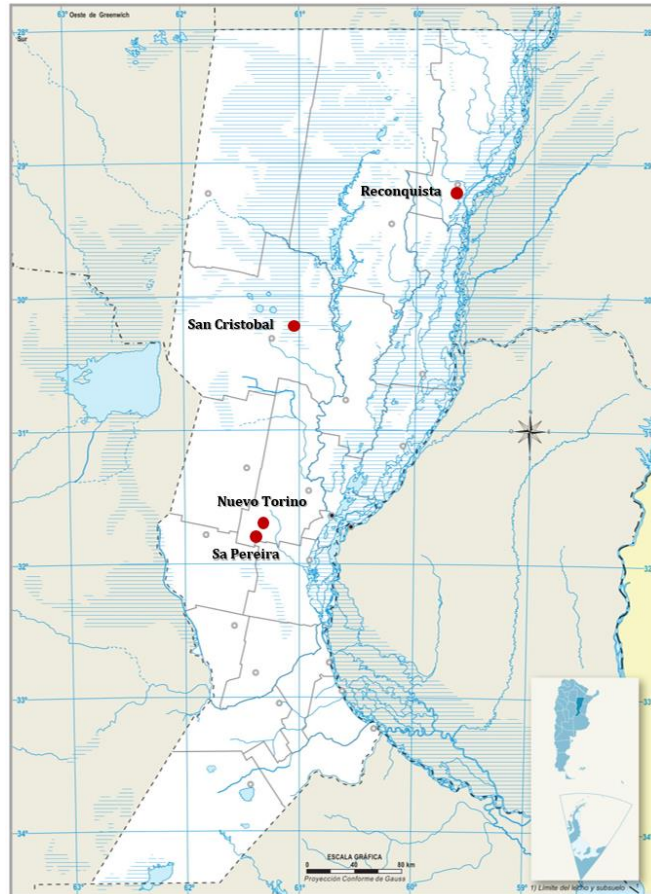


Figura 5.2. Localidades donde se realizaron los muestreos en cuevas o madrigueras con la presencia de adultos y/o huevos de *S. merianae*. Barra= 80 km.

5.2.1.2. Cuevas

En los sitios antes mencionados, las cuevas estaban construidas en la base de los troncos de árboles grandes como el paraíso (*Melia azedarach*), una especie muy utilizada en las cortinas vegetales que delimitan las parcelas en la zona agrícola de la región. También se han localizado cuevas en montículos de tierra o bien, al ras del terreno con abundante vegetación seca para formar la cámara de incubación que permitiera aislar la nidada de las condiciones climáticas externas. El material de incubación podía estar conformado por tierra, trozos de ramas, y en mayor proporción por vegetación que crecía a los alrededores de la madriguera, y con alta frecuencia de eventos de fumigación en los sitios cercanos a cultivos de soja, maíz, girasol. La hembra trasladaba esa vegetación a la madriguera antes de la postura y luego era cuidadosamente cortada en trozos muy pequeños, acumulando grandes cantidades para generar el lecho de incubación de los huevos.

5.2.2. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

5.2.2.1. Adultos

Se realizó la captura de machos (N= 4) y/o hembras adultas (N= 22) en cuevas identificadas (con o sin huevos) de zonas expuestas y zonas control para la obtención de muestras sanguíneas, de acuerdo a las condiciones mencionadas en el apartado 2.2.3. Luego, todos los adultos fueron medidos en LHC (Fig. 5.3), manteniendo el criterio de no manipularlos por más de 2 minutos para evitar el estrés, principalmente si el animal se encontraba en estado de gravidez. Por lo tanto, todos los animales fueron liberados en forma inmediata al finalizar la toma de muestras y mediciones correspondientes.



Figura 5.3. Medición de LHC de una hembra de la zona no expuesta. Barra= 35 cm.

Es importante mencionar que durante en el primer muestreo (año 2013), luego de la extracción de las muestras de sangre de los animales adultos se realizaron *in situ* los extendidos para el ensayo de MN-citoma y el volumen de sangre restante para aplicar el EC fue guardados en una conservadora con hielo. En el traslado, 9 de 16 muestras (5 de ejemplares de zona no expuesta y 4 de zona expuesta) tomaron contacto con el hielo, provocando la hemólisis de las mismas. Todos los datos de los ejemplares adultos se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Datos de adultos de *S. merianae* muestreados

Año M	Nro	Zona de muestreo	Coordenadas del sitio	Localidad	Sexo	Muestra Sangre	Nido	Sangre Neo	Observaciones
2013	1	No expuesta	31°28'51.19"S 61°17'10.31"O	Sa Pereira	♀	M5	-	No	No grávida
	2	No expuesta	31°28'49.48"S 61°17'7.19"O	Sa Pereira	♀	M6	-	No	No grávida
	3	No expuesta	31°28'46.40"S 61°17'8.49"O	Sa Pereira	♀	M7	-	No	No grávida
	4	No expuesta	31°28'53.62"S 61°17'33.18"O	Sa Pereira	♀	M8	-	No	No grávida
	5	No expuesta	31°29'0.57"S 61°17'16.00"O	Sa Pereira	♀	M9	-	No	No grávida
	6	No expuesta	31°19'30.88"S 61°12'0.92"O	Nvo Torino	♀	M13	7	Si	
	7	No expuesta	31°19'14.76"S 61°12'25.34"O	Nvo Torino	♂	M14 *	-	No	----
	8	No expuesta	31°19'14.76"S 61°12'25.34"O	Nvo Torino	♀	M15 *	-	No	No grávida
	9	Expuesto	31°35'55.89"S 61°22'18.44"O	Sa Pereira	♀	M1	-	No	Grávida
	10	Expuesto	31°36'13.85"S 61°22'13.21"O	Sa Pereira	♀	M2	-	No	No grávida
	11	Expuesto	31°35'47.26"S 61°23'14.15"O	Sa Pereira	♂	M3	-	No	-----
	12	Expuesto	31°32'17.65"S 61°26'34.45"O	Sa Pereira	♀	M4	9	Si	----
	13	Expuesto	31°20'45.03"S 61°13'48.17"O	Nvo Torino	♀	M10	10	Si	----
	14	Expuesto	31°20'45.46"S 61°13'45.96"O	Nvo Torino	♀	M11	11	Si	con 2 colas
	15	Expuesto	31°20'48.18"S 61°13'43.12"O	Nvo Torino	♂	M12	-	No	----
	16	Expuesto	31°20'58.78"S 61°12'41.86"O	Sa Pereira	♀	M16	12	Si	----
2014	17	No expuesta	31°35'5.46"S 61°18'57.16"O	Sa Pereira	♀	M20	13	Si	----
	18	No expuesta	31°35'18.48"S 61°17'38.19"O	Sa Pereira	♀	M21	-	No	Grávida
	19	No expuesta	31°30'42.89"S 61°22'17.58"O	Sa Pereira	♀	M23	14	Si	----
	20	No expuesta	31°30'23.55"S 61°21'48.97"O	Sa Pereira	♀	M24	-	No	No grávida
	21	Expuesto	31°33'41.59"S 61°23'51.02"O	Sa Pereira	♀	M17	16	Si	----
	22	Expuesto	31°34'52.53"S 61°20'9.83"O	Sa Pereira	♀	M18 **	-	No	Grávida
	23	Expuesto	31°34'52.53"S 61°20'9.83"O	Sa Pereira	♂	M19 **	-	No	----
	24	Expuesto	31°37'18.79"S 61°18'45.12"O	Sa Pereira	♀	M22	20	Si	----
	25	Expuesto	31°31'10.92"S 61°22'27.29"O	Sa Pereira	♀	M25	19	Si	----
	26	Expuesto	31°31'11.15"S 61°22'37.85"O	Sa Pereira	♀	M26	18	Si	----

Año M: año de muestreo de los animales; **Nro:** número de animal; **♀:** hembra; **♂:** macho; **Neo:** neonatos

* Hembra y macho, presentes en la misma madriguera al momento de la toma de la muestra

** Hembra y macho, presentes en la misma madriguera al momento de la toma de la muestra

5.2.2.2. Neonatos

Teniendo en cuenta lo antes mencionado respecto de la temporada reproductiva de la especie, la cosecha de huevos se realizó a principios de enero de los años 2013 (N= 48), 2014 (N= 53) y 2015 (N= 98), en las zonas expuestas a agroquímicos y en las zonas consideradas como control. En cada muestreo, los nidos fueron marcados con coordenadas de GPS para su posterior localización. Los huevos se dejaron incubando en la naturaleza al cuidado de la hembra y fueron cosechados cerca del final del periodo de incubación (Fig. 5.4). Luego, se trasladaron inmediatamente a las instalaciones del PI para completar los días restantes de incubación de modo artificial hasta la eclosión de las crías.



Figura 5.4. Vista del interior de la cueva de una iguana overa donde se observa la cámara de incubación con los huevos apoyados sobre una base de material de nido muy húmedo (foto izquierda; barra= 2 cm), y vista superior de la cámara de incubación extraído del nido conteniendo los huevos en su interior (foto derecha; barra= 5 cm).

Al producirse la eclosión y dentro de las 24 horas siguientes, se obtuvieron muestras de sangre periférica de todos los neonatos, tal como fue descrito en el apartado 2.2.3. En más del 50% de los muestreos, se tuvo éxito de cosechar nidos en madrigueras donde también estaba presente la hembra y/o el macho, obteniéndose así muestras de sangre parental y su progenie (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Datos de nidos de *S. merianae* cosechados en las zonas muestreadas

Año	Nro Nido	Cant. de huevos	Muestra Adulto	Zona de muestreo	Coordenadas		Sitio
2013	1	8	-	No expuesta	30°13'40.07"S	61°59'46.23"O	San Cristóbal
	2	8	-	No expuesta	30°19'70.33"S	61°01'37.20"O	San Cristóbal
	3	8	-	No expuesta	30°16'75.96"S	60°98'39.48"O	San Cristóbal
	4	8	-	Expuesto	31°33'26.22"S	61°29'12.36"O	Sa Pereira
	5	8	-	Expuesto	31°33'13.87"S	61°27'46.62"O	Sa Pereira
	6	8	-	Expuesto	31°52'43.11"S	61°37'63.08"O	Sa Pereira
2014	7	10	M13	No expuesta	31°19'30.88"S	61°12'0.92"O	Nuevo Torino
	8	8	-	No expuesta	31°33'55.58"S	61°21'26.47"O	Nuevo Torino
	9	7	M4	Expuesto	31°32'17.65"S	61°26'34.45"O	Sa Pereira
	10	8	M10	Expuesto	31°20'45.03"S	61°13'48.17"O	Nuevo Torino
	11	10	M11	Expuesto	31°20'45.46"S	61°13'45.96"O	Nuevo Torino
	12	10	M16	Expuesto	31°20'58.78"S	61°12'41.86"O	Nuevo Torino
2015	13	8	M20	No expuesta	31°35'5.46"S	61°18'57.16"O	Sa Pereira
	14	10	M23	No expuesta	31°30'42.89"S	61°22'17.58"O	Sa Pereira
	15	10	-	No expuesta	29°40'26.90"S	60°55'28.00"O	San Cristóbal
	16	10	M17	Expuesto	31°33'41.59"S	61°23'51.02"O	Sa Pereira
	17	10	-	Expuesto	29°15'1.85"S	59°42'34.03"O	Reconquista
	18	10	M26	Expuesto	31°31'11.15"S	61°22'37.85"O	Sa Pereira
	19	10	M25	Expuesto	31°31'10.92"S	61°22'27.29"O	Sa Pereira
	20	10	M22	Expuesto	31°37'18.79"S	61°18'45.12"O	Sa Pereira
	21	10	-	Expuesto	31°33'43.59"S	61°17'47.74"O	Sa Pereira
	22	10	-	Expuesto	31°33'41.25"S	61°17'47.21"O	Sa Pereira

Nro: número; **Cant.:** cantidad

5.2.3. VARIABLES REGISTRADAS

5.2.3.1. Datos morfométricos

En los adultos, se registró sólo la medida de LHC de cada animal por presentar algunas dificultades el pesaje de animales adultos durante el trabajo a campo. En tanto que, para los neonatos, las mediciones de LHC y peso se realizaron en el mismo día de la eclosión o dentro de las 24 hs posteriores, mediante una cinta métrica (0,1 cm de precisión) y una balanza eléctrica CS200-0W0 200 gr (0,1 gr de precisión).

5.2.3.2. Genotoxicidad

A partir de las muestras de sangre entera de los adultos y de los neonatos, se aplicaron el EC, MN y la presencia de otras AN en los eritrocitos (enfoque citoma), siguiendo las condiciones mencionadas en los apartados 2.2.4 y 2.2.5 (Capítulo II) y 3.2.4.2.4 (Capítulo III), respectivamente.

5.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas tanto para los datos obtenidos de los neonatos como de los adultos. En el caso de los neonatos se aplicó la prueba de Rachas (Conover, 1998; Montgomery, 2004) para determinar la independencia de los datos en cada nido, tomando como valor de corte la media muestral. Los datos de morfometría y de genotoxicidad de neonatos y de adultos se informan por año de muestreo como la media \pm desvío estándar (DE). Para conocer si existieron diferencias significativas en las medidas morfométricas y en la genotoxicidad de los neonatos y adultos entre los años analizados dependiendo de la zona de muestreo, se realizó un ANOVA factorial mediante el Modelo Lineal General Multivariante (MLGM), tomando los valores de morfometría y de genotoxicidad como variables dependientes, y la zona y año de muestreo (expuestos y no expuestos) como variables de agrupamiento. Se aplicó el Test de Bonferroni como análisis Post Hoc en las variables analizadas. Se realizó, además, una comparación de pares de las medias marginales de cada variable de agrupamiento y todas las posibles interacciones entre ellas, aplicando el ajuste de Bonferroni.

Es importante aclarar que, en el caso de los adultos, en la temporada 2013 hubo menos muestras en las que se aplicó Ensayo Cometa debido a que 9 de estas (5 de la zona no expuesta y 4 de expuestos) no fueron adecuadas para este ensayo, por lo que sólo se utilizaron para el análisis estadístico 3 muestras de adultos de no expuestos y 4 muestras de expuestos. Para ambas temporadas, los datos de EritA fueron desestimados en el análisis estadístico por falta de valores distintos de 0. Por otra parte, en ambas temporadas de muestreo se desestimó la comparación entre sexos debido al escaso número de machos adultos.

Se aplicó regresión lineal y cuadrática entre las medidas morfométricas y los valores de MN, ANT e ID para cada año de muestreo, y se aplicó también entre los valores de MN, ANT e ID de los parentales y las crías para ver si hay una tendencia. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. ADULTOS

Los valores individuales y las medias (\pm DE) de LHC de los adultos muestreados en zonas expuestas a plaguicidas y en zonas no expuestas, de acuerdo al año de muestreo y el sexo se presentan en las Tablas 5.3 y 5.4, respectivamente.

Tabla 5.3. Parámetros individuales de LHC de adultos de *S. merianae* por año de muestreo y la zona de muestreo

Año de muestreo	Nro Ejemplar	Zona de muestreo	Muestra Sangre	Sexo	LHC (cm)
2013	1	No Expuesto	M5	♂	39,5
	2	No Expuesto	M6	♂	39,5
	3	No Expuesto	M7	♂	39,5
	4	No Expuesto	M8	♂	38
	5	No Expuesto	M9	♂	39,5
	6	No Expuesto	M13	♂	34
	7	No Expuesto	M14	♂	36
	8	No Expuesto	M15	♂	36,5
	9	Expuesto	M1	♂	36,5
	10	Expuesto	M2	♂	38,5
	11	Expuesto	M3	♂	41
	12	Expuesto	M4	♂	38,5
	13	Expuesto	M10	♂	29,5
	14	Expuesto	M11	♂	39,5
	15	Expuesto	M12	♂	39,5
	16	Expuesto	M16	♂	42
2014	17	No Expuesto	M20	♂	40
	18	No Expuesto	M21	♂	32
	19	No Expuesto	M23	♂	37,5
	20	No Expuesto	M24	♂	42,5
	21	Expuesto	M17	♂	37,5
	22	Expuesto	M18	♂	31
	23	Expuesto	M19	♂	37
	24	Expuesto	M22	♂	38,5
	25	Expuesto	M25	♂	40
	26	Expuesto	M26	♂	41,5

Nro: número; LHC: longitud hocico-cloaca; cm: centímetro; ♀: hembra; ♂: macho

Tabla 5.4. Media (\pm DE) de LHC de adultos de *S. merianae*, según el sexo y año de muestreo

Año de Muestreo	Zona de muestreo	n	LHC (cm)		
			Hembras	Machos	Total
2013	No Expuesto	1♂ 7♀	38,07 \pm 2,13	36,00 \pm 0,00 *	37,81 \pm 2,10
	Expuesto	2♂ 6♀	37,42 \pm 4,27	40,24 \pm 1,06	38,12 \pm 3,86
2014	No Expuesto	4♀	38,00 \pm 4,49	-----	38,00 \pm 4,49
	Expuesto	1♂ 5♀	37,70 \pm 4,04	37,00 \pm 0,00 *	37,58 \pm 3,62

LHC: longitud hocico-cloaca; **cm:** centímetro; **n:** cantidad de individuos; ♀: hembra; ♂: macho
 * Único individuo

La comparación de la LHC de las iguanas determinó que los adultos de zona expuesta no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto de los animales de zonas no expuestas, así como entre el año de muestreo ni en la interacción entre estas variables ($p > 0,05$; *ANOVA factorial*). La comparación de la talla de acuerdo al sexo de las iguanas no se pudo realizar debido al escaso número de machos capturados en los años de muestreos (Tabla 5.4).

Los valores medios (\pm DE) de genotoxicidad evaluados por el Ensayo de MN, AN y EC de los adultos discriminados por condición de exposición y año de muestreo se observan en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Genotoxicidad (media \pm DE) en adultos de *S. merianae* muestreados, de acuerdo al año y zona de muestreo.

ADULTOS	Año 2013		Año 2014	
	No Expuesto (n= 8)	Expuesto (n=8)	No Expuesto (n=4)	Expuesto (n=6)
Índice de Daño	228,67 \pm 34,87 *	259,80 \pm 30,17 **	145,50 \pm 21,99	148,33 \pm 18,51
Frec. de MN	4,13 \pm 2,59	2,50 \pm 1,07	1,50 \pm 1,29	5,00 \pm 8,51
Brote Nuclear	4,63 \pm 5,18	2,50 \pm 2,20	6,00 \pm 5,48	5,66 \pm 5,24
Núcleo con Muesca	2,75 \pm 3,37	2,50 \pm 2,45	9,50 \pm 3,00	4,33 \pm 2,25
Núcleo Irregular	15,00 \pm 22,68	13,50 \pm 15,19	19,00 \pm 15,36	9,17 \pm 8,91
Núcleo Excéntrico	2,25 \pm 1,67	1,63 \pm 2,33	2,00 \pm 1,41	2,17 \pm 1,83
Eritrocito Anucleado	0,00 \pm 0,00	0,12 \pm 0,35	0,00 \pm 0,00	1,17 \pm 0,84
ANT	24,63 \pm 27,42	20,25 \pm 20,55	36,50 \pm 23,29	21,33 \pm 12,75

ANT: anormalidades nucleares totales; **n:** cantidad de individuos

*La media (\pm DE) corresponde a 3 individuos (ver aclaración apartado 5.2.2.1)

**La media (\pm DE) corresponde a 4 individuos (ver aclaración apartado 5.2.2.1)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en FMN, BN, NI, NE y ANT entre los adultos expuestos y no expuestos para ambos años de muestreo analizados individualmente ($p > 0,05$; *ANOVA factorial*). Sin embargo, el ID y NM mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre 2013 y 2014 ($F = 59,452$, $p < 0,01$; $F = 13,986$, $p = 0,01$, respectivamente; *ANOVA factorial*). Al analizarse la interacción entre zonas (expuesto y no expuesto) y el año de muestreo, se observó una diferencia estadísticamente significativa en los valores de NM ($F = 4,589$, $p = 0,043$; *ANOVA factorial*). Por otra parte, se encontró una relación débil solo entre la FMN y la LHC con modelo lineal ($p = 0,027$; $R^2 = 0,479$) y una relación moderada con modelo cuadrático ($p = 0,036$; $R^2 = 0,614$) en los adultos del año 2014, pero no se observó relación alguna entre los valores de genotoxicidad y la LHC en los animales del año 2013 ($p > 0,05$ en todos los casos; RLS).

5.3.2. NEONATOS

La prueba de Rachas indicó la independencia de los datos para todas las variables de genotoxicidad en todos los nidos y años de muestreo: **2013**: $p > 0,066$; **2014** $p > 0,094$; **2015**: $p > 0,058$. En el caso de las variables morfométricas, la independencia se cumplió en todos los nidos en el año 2013 ($p > 0,056$) y 2014 ($p > 0,149$), pero en el 2015 hubo dos nidos que no cumplieron con dicha independencia (nidos 17 y 21, $p < 0,05$), por lo que, si bien se incluyen en los valores de media y DE, no fueron tenidos en cuenta en el análisis estadístico. Los valores medios de la morfometría de las crías recién nacidas por nido y año de muestreo de acuerdo a las zonas no expuestas y expuestas a plaguicidas se presentan en la Tabla 5.6 y 5.7.

Tabla 5.6. Medias (\pm DE) de la morfometría de neonatos de *S. merianae* de acuerdo al año, nido y la zona de muestreo

Año de eclosión post-muestreo	Nro nido	Cant. de crías	Zona de muestreo	Peso (gr)	LHC (cm)	N° Parental Tabla 5.3
2013	1	8	No Expuesto	15,91 \pm 1,08	8,45 \pm 0,19	----
	2	8	No Expuesto	18,57 \pm 1,48	8,56 \pm 0,30	----
	3	8	No Expuesto	17,44 \pm 0,47	8,56 \pm 0,21	----
	4	8	Expuesto	11,15 \pm 1,37	7,37 \pm 0,31	----
	5	8	Expuesto	16,35 \pm 1,50	8,64 \pm 0,34	----
	6	8	Expuesto	15,9 \pm 1,32	8,85 \pm 0,19	----
2014	7	10	No Expuesto	15,77 \pm 1,13	8,54 \pm 0,29	6
	8	8	No Expuesto	14,50 \pm 2,34	8,20 \pm 0,42	----
	9	7	Expuesto	11,04 \pm 0,81	7,64 \pm 0,21	12
	10	8	Expuesto	11,72 \pm 1,47	7,66 \pm 0,44	13
	11	10	Expuesto	16,30 \pm 0,95	8,73 \pm 0,19	14
	12	10	Expuesto	15,19 \pm 1,65	8,48 \pm 0,28	16
2015	13	8	No Expuesto	8,67 \pm 1,17	6,95 \pm 0,40	17
	14	10	No Expuesto	10,96 \pm 1,04	7,52 \pm 0,19	19
	15	10	No Expuesto	10,96 \pm 2,12	7,56 \pm 0,45	----
	16	10	Expuesto	9,79 \pm 1,46	7,19 \pm 0,43	21
	17	10	Expuesto	17,23 \pm 2,16	8,58 \pm 0,39	----
	18	10	Expuesto	12,91 \pm 1,46	7,94 \pm 0,22	24
	19	10	Expuesto	16,67 \pm 2,09	8,71 \pm 0,31	25
	20	10	Expuesto	12,82 \pm 1,56	7,59 \pm 0,56	26
	21	10	Expuesto	13,12 \pm 1,09	8,20 \pm 0,31	----
	22	10	Expuesto	12,97 \pm 0,72	8,26 \pm 0,17	----

Nro: número; **Cant.:** cantidad; **gr:** gramos; **LHC:** longitud hocico-cloaca; **cm:** centímetro.

Tabla 5.7. Medias (\pm DE) de morfometría de neonatos de *S. merianae* de acuerdo al año eclosión y la zona de muestreo.

Año de Eclosión	Zona de Muestreo	Peso (gr)	LHC (cm)
2013	No Expuesto (n= 24)	17,31 \pm 1,53	8,52 \pm 0,23
	Expuesto (n= 24)	14,46 \pm 2,75	8,29 \pm 0,72
2014	No Expuesto (n= 18)	15,20 \pm 1,83	8,39 \pm 0,39
	Expuesto (n= 35)	13,88 \pm 2,55	8,20 \pm 0,56
2015	No Expuesto (n= 28)	10,31 \pm 1,82	7,37 \pm 0,44
	Expuesto (n= 70)	13,64 \pm 2,81	8,07 \pm 0,61

gr: gramos; **LHC:** longitud hocico-cloaca; **cm:** centímetro.

La prueba de efectos inter-sujetos de *ANOVA factorial* mostró que la LHC de los neonatos presentó diferencias estadísticamente significativas entre los años de muestreo ($F= 33,689$, $p < 0,001$) y la interacción entre esta variable y la zona de muestreo ($F= 10,497$, $p < =0,001$; *ANOVA factorial*. Figura 5.5). El efecto simple de la variable año de muestreo mostró diferencias significativas entre 2013 y 2014 respecto del 2015 ($p < 0,001$; *ANOVA factorial, Bonferroni*). La interacción de las variables

mostró una diferencia estadísticamente significativa en la LHC de las crías no expuestas en el año 2015 respecto de los otros dos años ($p < 0,001$; ANOVA factorial, Bonferroni). Además, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la LHC entre las crías de zona expuesta y no expuestas sólo en el 2015 ($p < 0,001$; ANOVA factorial, Bonferroni. Figura 5.5).

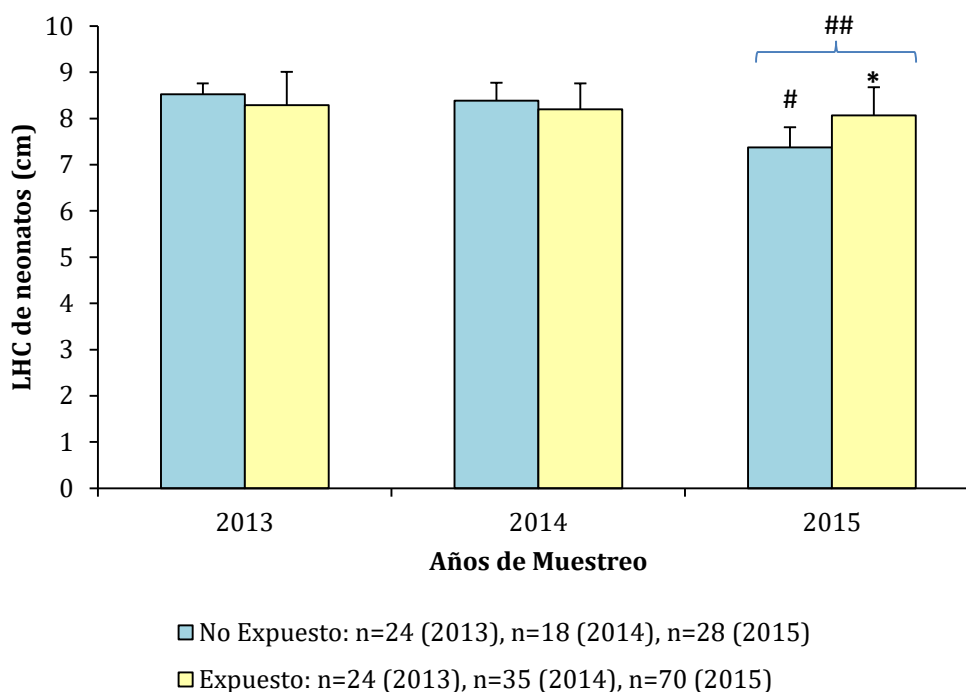


Figura 5.5. LHC (media \pm DE) de neonatos de *S. merianae* expuestos y no expuestos ambientalmente a plaguicidas de las tres temporadas monitoreadas. *Indica diferencia estadísticamente significativa entre expuesto y no expuesto de ese año ($p < 0,001$, medias marginales, Bonferroni). # Indica diferencia significativa en crías no expuestas del 2015 con los demás años. ## Indica diferencia significativa del 2015 respecto de los demás años ($p < 0,001$; ANOVA factorial, Bonferroni).

En el caso del peso de los neonatos, la prueba de efectos inter-sujetos mostró diferencias estadísticamente significativas entre los años de muestreo ($F = 51,595$; $p < 0,001$), específicamente entre 2013 respecto de 2014 y 2015 así como entre 2014 y 2015 ($p < 0,01$; ANOVA factorial, Bonferroni). También se encontraron diferencias significativas en la interacción entre el año y la zona de muestreo ($F = 23,126$, $p < 0,001$), ya que se observó diferencias entre expuestos y no expuestos en los años 2013 y 2015 ($p < 0,01$) pero no en 2014, así como entre el 2013 y los otros dos años en crías no expuestas ($p < 0,01$, ANOVA factorial; Figura 5.6). Mientras que el peso de los animales de zona expuesta a plaguicidas no mostró diferencias significativas entre los años ($p > 0,05$; ANOVA factorial).

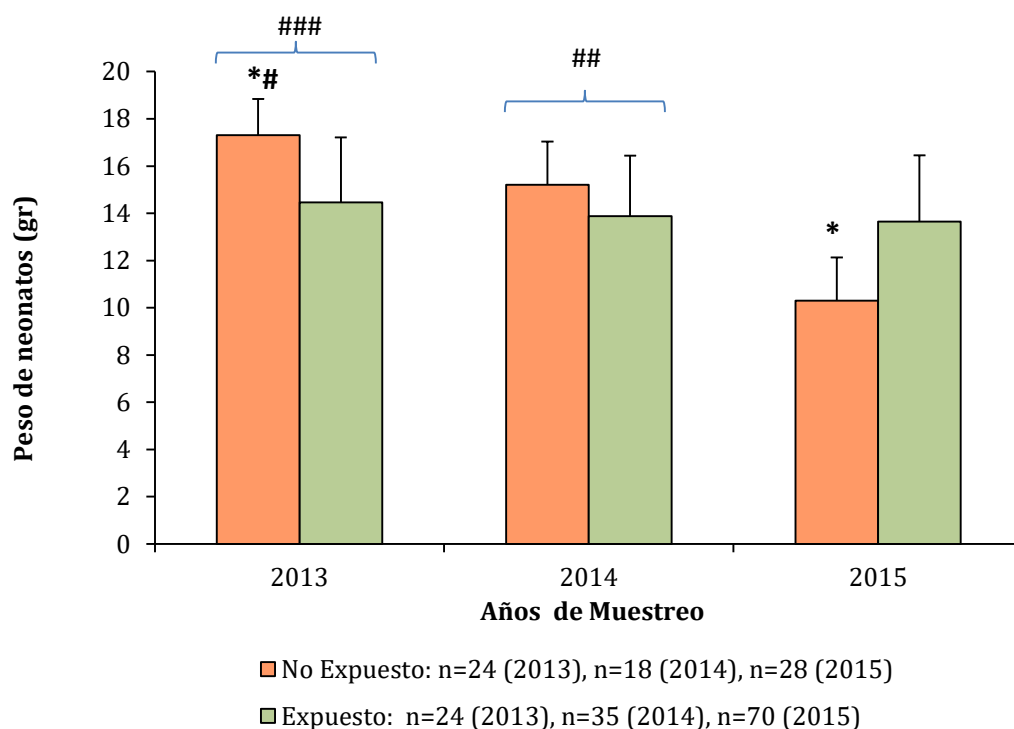


Figura 5.6. Peso (media \pm DE) de neonatos de *S. merianae* expuestos y no expuestos *in situ* a plaguicidas de las tres temporadas monitoreadas. *Indica diferencia estadísticamente significativa entre expuesto y no expuesto en esos años ($p < 0,001$; medias marginales, Bonferroni). #Indica diferencia significativa entre 2013 y los demás años en crías no expuestas. ## Indica diferencia significativa entre 2014 y 2015, y ### entre 2013 y los demás años ($p < 0,01$, ANOVA factorial).

La prueba de efectos inter-sujetos de ANOVA factorial mostró diferencias estadísticamente significativas entre los años de muestreo para todas las variables de genotoxicidad ($F = 4,367 - 130,614$; $p < 0,001$), así como entre las zonas de muestreo para el ID, FMN, BN, NM, NI, NE y ANT ($F = 4,991 - 90,237$; $p < 0,05$) y en la interacción entre año y zona de muestreo para ID y BN ($F = 19,941$ y $4,605$, $p < 0,05$; ANOVA factorial). En la comparación entre los años de muestreo, específicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en el ID, en el NI y en las ANT entre 2013 y los dos años posteriores ($p < 0,001$), al igual que en la FMN ($p < 0,01$; Tabla 5.8). En el caso de BN, NE y EritA se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 2015 y los dos años anteriores ($p < 0,01$) y en el NM entre 2014-2015 ($p = 0,001$; ANOVA factorial, Bonferroni). En cuanto a la zona de muestreo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la zona expuesta y no expuesta en el ID en los 3 años, en la FMN en los dos últimos años, en BN, NM, NI y ANT solo en el

primer año y, por último, en el NE solo en el tercer año ($p < 0,05$; medias marginales, Bonferroni, Tabla 5.8). En la interacción de las variables independientes, las diferencias significativas en el ID se observaron entre 2013 y los 2 años posteriores tanto en zona expuesta como no expuesta ($p < 0,01$), mientras que en BN fue entre 2015 y los 2 años anteriores sólo en la zona no expuesta ($p < 0,05$, medias marginales, Bonferroni).

Tabla 5.8. Genotoxicidad (media \pm DE) en neonatos de *S. merianae* de acuerdo al año de eclosión y la zona de muestreo.

	Año 2013		Año 2014		Año 2015	
	No Expuesta (n=24)	Expuesta (n=24)	No Expuesta (n=18)	Expuesta (n=35)	No Expuesta (n=28)	Expuesta (n=70)
ID	146,21 \pm 20,68	276,83 \pm 113,57*	107,88 \pm 5,29	156,31 \pm 32,31*	108,54 \pm 10,57	134,13 \pm 31,02*
FMN	0,16 \pm 0,38	1,25 \pm 1,26	0,44 \pm 0,51	2,74 \pm 1,75*	0,79 \pm 0,99	2,76 \pm 2,97*
BN	1,58 \pm 1,47	6,00 \pm 3,39*	2,77 \pm 1,83	4,57 \pm 2,93	5,89 \pm 4,43	6,07 \pm 4,85
NM	6,58 \pm 4,31	10,87 \pm 9,21*	4,50 \pm 3,29	8,00 \pm 7,32	9,79 \pm 5,55	11,39 \pm 7,23
NI	75,25 \pm 17,58	92,62 \pm 46,04*	25,28 \pm 13,89	29,31 \pm 25,49	18,64 \pm 12,33	20,76 \pm 12,84
NE	2,33 \pm 1,88	2,37 \pm 1,97	3,55 \pm 2,93	2,88 \pm 2,93	4,64 \pm 3,84	6,97 \pm 7,65*
EritA	1,29 \pm 1,08	0,96 \pm 1,43	0,66 \pm 1,28	1,37 \pm 2,92	2,32 \pm 2,46	2,21 \pm 2,17
ANT	87,04 \pm 21,63	112,83 \pm 55,02*	36,78 \pm 18,32	46,14 \pm 33,17	41,29 \pm 17,93	47,40 \pm 22,00

DE: desvío estándar; **ID:** Índice de Daño; **FMN:** Frecuencia de MN; **BN:** Brote Nuclear; **NM:** Núcleo con Muesca; **NI:** Núcleo Irregular; **NE:** Núcleo Excéntrico; **EritA:** Eritrocito Anucleado; **ANT:** sumatoria de Anormalidades Nucleares.

*Diferencia estadísticamente significativa respecto de la zona no expuesta ($p < 0,05$; ANOVA factorial, medias marginales, Bonferroni). Celdas rosadas: Diferencia estadísticamente significativa respecto del 2014 y 2015. Celdas amarillas: Diferencia estadísticamente significativa respecto de 2013 y 2014. Celda verde: Diferencia estadísticamente significativa respecto de 2015.

Los valores de ID y ANT respecto de la LHC de los neonatos del año 2013 se ajustan mejor a la curva del modelo cuadrático ($p < 0,001$, $R^2 = 0,292$; $p < 0,001$, $R^2 = 0,371$, respectivamente), mostrando una relación débil entre las variables. En los neonatos del año 2014, una relación débil fue observada solo entre ANT y el peso ($p = 0,001$, $R^2 = 0,188$, RLS) e ID y la LHC ($p < 0,001$, $R^2 = 0,248$; RLS). En tanto que, en los neonatos del año 2015, la relación débil fue observada entre ID para con el peso ($p = 0,003$, $R^2 = 0,089$, RLS) y la LHC ($p = 0,014$, $R^2 = 0,062$, RLS). El análisis de la media de los valores de MN, ANT e ID en las nidadas no mostró relación con los valores de genotoxicidad de sus parentales ($p > 0,05$ en todos los casos, RLS).

5.4. DISCUSIÓN

La capacidad y comprensión para predecir el impacto futuro de las prácticas agrícolas con alto consumo de plaguicidas no ha podido seguir el ritmo de la expansión desmedida en la búsqueda de mayores rendimientos económicos. Ante este panorama, es imprescindible el monitoreo biológico de las especies que habitan en los distintos ecosistemas que se ven afectados por el uso de los plaguicidas dado el daño potencial que se puede asociar a estas prácticas en las poblaciones naturales que no objeto específico de su aplicación. La detección de respuestas de toxicidad a nivel sub-individual (moleculares, bioquímicas, fisiológicas, histológicas) resulta fundamental para comprender tempranamente esas “señales de alerta” sobre el daño ambiental provocado, antes de que llegue a un nivel de irreversibilidad (Van der Oost *et al.*, 2003).

El monitoreo de las iguanas durante 3 temporadas reproductivas en campos con alta actividad agrícola y en ambientes con bajo nivel de perturbación brindó una caracterización de los valores de daño al ADN de referencia para la especie *S. merianae*, que hasta el momento carecía de datos de genotoxicidad y morfométricos asociados de poblaciones naturales. En las iguanas adultas, los valores que arrojaron los indicadores de genotoxicidad fueron similares en los dos años de muestreos, sin diferencias significativas entre los individuos de zonas expuestas y zonas no expuestas a plaguicidas ($p > 0,05$; *ANOVA factorial*). Si comparamos estos valores con los obtenidos en los adultos en cautiverio utilizados para la determinación de daño basal en ese rango de edad (Capítulo II), se puede observar que los animales del campo presentaban valores de genotoxicidad similares a estos. Los neonatos de *S. merianae* ambientalmente expuestos a plaguicidas, por el contrario, mostraron FMN e ID significativamente más altos que los de zonas no expuestas, y estos valores variaron entre los años de muestreo. El ID más alto fue observado en el primer año (2013) y fue disminuyendo hacia el tercer año de muestreo ($276,83 \pm 113,57$; $156,31 \pm 32,31$; $134,13 \pm 31,02$, respectivamente; *ANOVA factorial*, MLGM). La FMN mostró un comportamiento inverso, aumentando sus valores desde el primer al tercer año de muestreo ($1,25 \pm 1,26$; $2,74 \pm 1,75$; $2,76 \pm 2,97$, respectivamente; *ANOVA factorial*, MLGM). En el caso de las AN, todas las figuras mostraron

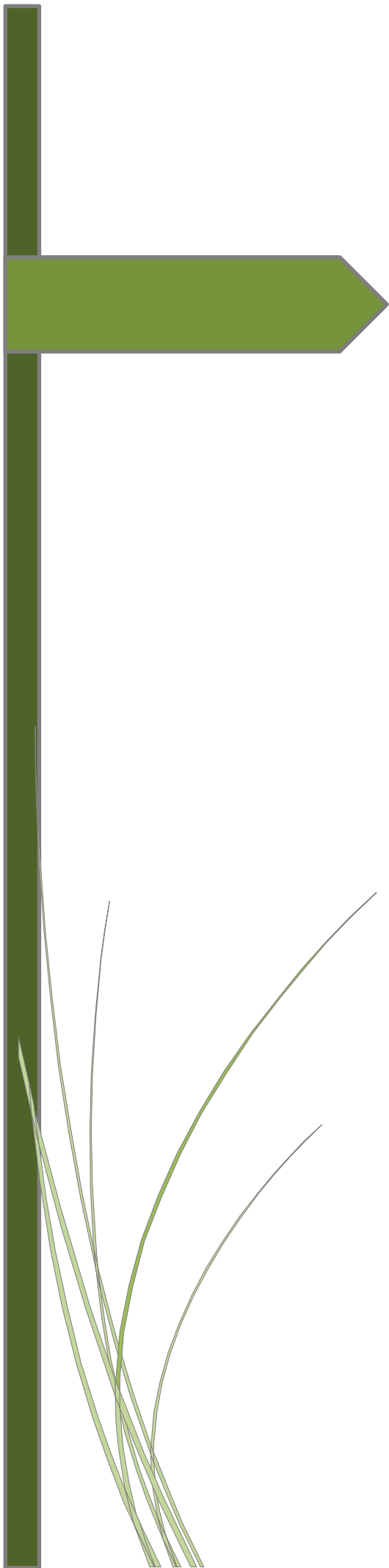
resultados fluctuantes entre los años muestreados, con valores significativamente más altos en las distintas figuras, a excepción de EritA y NE, en el primer año de muestreo. Mientras que, en el tercer año, sólo la figura NE de crías de zonas expuestas ambientalmente a plaguicidas mostro diferencias significativa (*ANOVA factorial*, MLGM). Más allá de las variaciones, los valores de ID y BN son comparables con los resultados obtenidos en el experimental de exposición *in ovo* presentado en el Capítulo III, donde se evaluó la mezcla de los tres plaguicidas bajo condiciones de laboratorio (ID: $200,25 \pm 20,16$; BN: $5,25 \pm 3,77$; EB2, Fig. 3.11 y Tabla 3.17, respectivamente), no es el caso de la FMN. Varios estudios *in situ* han detectado valores más altos de genotoxicidad en diferentes especies que habitan en áreas agrícolas, en comparación con áreas de referencia. En un trabajo de biomonitoreo de renacuajos provenientes de estanques ubicados en campos de soja y de maíz, se observó un ID significativamente mayor al obtenido en los ejemplares de áreas no agrícolas (Gonçalves *et al.*, 2017). Un estudio de monitoreo de aves que habitaban en fincas de café reveló que las especies con dieta generalista encontradas en las áreas de estudio tenían más probabilidades de estar contaminadas por plaguicidas que las aves insectívoras, debido a la dieta diversificada. Además, la especie *Volatinia jacarina* más abundante en las tres fincas mostró una FMN mayor, cuanto más grande era el área de esos lugares y, por ende, mayor la dosis de plaguicidas utilizados (Souto *et al.*, 2018). Es posible que los resultados de genotoxicidad observados en los neonatos de *S. merianae* se deban a que los mecanismos de protección que están disponibles en el adulto, como un sistema inmune competente, enzimas detoxificantes de la actividad metabólica del hígado y una barrera hematoencefálica del cerebro, y los mecanismos de reparación del ADN, no sean completamente funcionales en los individuos recién nacidos (Newbold *et al.*, 2007). Por otra parte, la eliminación de los eritrocitos con MN o AN suele estar a cargo del bazo y del hígado que durante el desarrollo embrionario se encuentran en constante cambio (Stončius y Lazutka, 2003). De acuerdo con algunos autores, las respuestas metabólicas y enzimáticas recién se hacen funcionales en los juveniles y pueden actuar como mecanismos protectores contra las sustancias tóxicas (Paulino *et al.*, 2012; Turcotte y Talbot, 2013). Es posible que, por esta razón, no se evidenciara genotoxicidad en las iguanas adultas, incluyendo las hembras capturadas junto con su nidada, mientras que los resultados

positivos observados en los neonatos sustentarían la hipótesis planteada en esta Tesis acerca de la exposición de los huevos en ambientes naturales, principalmente por el pasaje de los plaguicidas desde el material de nido durante la incubación de los mismos. Cabe mencionar, que las condiciones de incubación son factores muy determinantes para la supervivencia de la nidada, en particular en el tamaño corporal. La incidencia negativa de los plaguicidas en dicho periodo permitiría explicar el menor peso y LHC de los neonatos de *S. merianae* incubados en zonas expuestas a plaguicidas, con relación al tamaño de aquellos que se incubaron en zonas no expuestas observado en los dos primeros años de muestreo (2013 y 2014). Asimismo, todos los neonatos de *S. merianae* nacidos de huevos expuestos ambientalmente a plaguicidas mostraron valores de talla más bajos que los obtenidos en la exposición *in ovo* a la mezcla de plaguicidas en condiciones controladas de laboratorio (peso: 17,10 g y LHC: 8,60 cm; Capítulo III). En relación con nuestros hallazgos, Marco *et al.* (2004) demostraron que la exposición *in ovo* a ciertos fertilizantes en dos especies de lagartos del género *Podarcis* generó un impacto negativo en la longitud de las crías. Por el contrario, un estudio realizado en crías de tres especies de aves (*Ardea purpurea*, *Egretta garzetta* y *Bubulcus ibis*) evidenció que los parámetros morfométricos en las poblaciones expuestas a contaminantes ambientales no presentaban diferencias significativas respecto de los animales en zonas de referencia, aunque los valores de MN en el sitio más contaminado eran elevados (Quirós *et al.*, 2008). Esta información no es menor dado que en muchos casos no se puede establecer claramente la diferencia estadística por un bajo número de individuos muestreados. Otro trabajo observó estrés oxidativo sin generación de efectos neurotóxicos en lagartos *P. muralis* asociado a una disminución en la aptitud física de los animales que estaban más expuestos a plaguicidas por un uso intensivo de la tierra (Mingo *et al.*, 2017). En el caso de *S. merianae*, la ausencia de efectos negativos a nivel genotóxico y en los parámetros morfométricos de los adultos puede ser indicativa de que los animales que ya no están en edad de crecimiento podrían hacer frente a los plaguicidas, compensando el nivel de exposición mediante mecanismos que aún no están dilucidados. La toxicidad de los plaguicidas cobra relevancia en torno al crecimiento y desarrollo de los animales, que probablemente será mayor durante las etapas pre-adultas, cuando su tasa determina las

probabilidades de supervivencia en la vida posterior (Ockleford *et al.*, 2018). El principal determinante de la capacidad de los animales para transformar y/o eliminar sustancias tóxicas de sus cuerpos será la velocidad a la que funcionan sus procesos metabólicos los que, para los reptiles a su vez, dependen de la temperatura corporal y, por consiguiente, de la temperatura ambiental. Esto tiene un costo de energía asociado, que puede alterar la relación entre la inversión metabólica y energética en la homeostasis, comprometiendo así otras funciones biológicas como el crecimiento, el desarrollo, la inmunidad o la reproducción (Ockleford *et al.*, 2018). De acuerdo con Stonèius (2009), la concentración de sustancias genotóxicas en el organismo de la madre y las que pudieran ingresar a través de la cáscara del huevo desde el ambiente durante la incubación, así como la capacidad de las crías para metabolizar esos contaminantes puede influir significativamente en la probabilidad de supervivencia de los juveniles. Por otra parte, la exposición crónica a agentes genotóxicos establecida en los ecosistemas puede ejercer una presión selectiva sobre los organismos, eliminando individuos o especies sensibles (Clements y Rohr, 2009). Entonces es posible que los individuos muestreados en el campo tengan un nivel de resistencia como resultado de la exposición crónica (Ceyca *et al.*, 2014). En este sentido, la exposición a los plaguicidas plantea un alto riesgo de conducir a pérdida de diversidad genética y mutaciones que pueden tener efectos nocivos sobre la capacidad reproductiva, la carcinogénesis y la supervivencia a largo plazo de la población de organismos expuesta (Dar *et al.*, 2015, 2016). Por otro lado, las mutaciones pueden conferir una ventaja selectiva que conduce a la selección de los genotipos resistentes, en búsqueda del mantenimiento de la integridad del ADN. La selección de la tolerancia heredada genéticamente en las poblaciones expuestas ha sido reconocida como una de las causas de los cambios en la estructura de la comunidad y el funcionamiento del ecosistema (Medina *et al.*, 2007). Por lo tanto, el costo de ser resistente puede cambiar la forma en que las especies explotan sus nichos ecológicos y contribuyen al funcionamiento de los ecosistemas (Mouneyrac y Amiard-Triquet, 2013). La identificación de diferentes especies centinelas y biomarcadores que se pueden aplicar para evaluar el daño al material genético en áreas contaminadas brinda herramientas de análisis novedosos que hasta el presente no eran objeto de

estudio en términos de favorecer con prácticas diferentes la supervivencia de estas especies (Gajski *et al.*, 2019).

Es importante mencionar algunos inconvenientes y observaciones realizadas en los muestreos. En varios puntos de muestreo no pudimos encontrar a la hembra en la cueva junto a su nidada, por eso sólo se obtuvieron datos de las crías. En otros casos, no se pudo realizar el pesaje de los animales adultos debido a inconvenientes con la balanza utilizada. En cuanto a los machos adultos, la ausencia de los mismos junto a la nidada y a la hembra se debió a que ellos abandonan las cuevas luego de la postura y se refugian en otras madrigueras con otras iguanas machos o animales de otras especies (observación personal de campo). Por otra parte, en el primer muestreo hubo una faltante de muestras de sangre de adultos que se perdieron tal como fue comentado en la metodología y, en consecuencia, no se pudo realizar el EC para esos animales adultos, pero si el Ensayo de MN-citoma. Durante el trabajo de campo, hemos encontrado cuevas dañadas o invadidas (en árboles, montículos de tierra) por individuos de otras especies, en esos casos al año siguiente observamos que los individuos habían construido nidos en los árboles adyacentes o en las proximidades, utilizando en forma casi exclusiva los árboles de la especie *M. azedarach* (paraíso; observación personal de campo). Si bien esta especie de árbol es una de las más abundantes en la región agrícola, hay otras especies y autóctonas que sobreviven en estos ecosistemas modificados. Suponiendo la disponibilidad de refugios, este comportamiento sugiere una tendencia a permanecer cerca de sus refugios más antiguos y de los sitios donde toman sol, exponiéndose a la una constante contaminación con plaguicidas (Lambert, 2005). Tal como refiere Lambert (2005), este escaso desplazamiento permite que los lagartos sean considerados bioindicadores útiles para analizar el grado de contaminación del hábitat, y en el caso de que fueran capaces de sobrevivir en estas zonas con tratamiento de plaguicidas, sus cargas de residuos se constituyen en marcadores biológicos de los niveles de plaguicidas que entran en las cadenas alimentarias de la fauna local.



CAPÍTULO VI:

Conclusiones y perspectivas

6.1. INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Podemos observar que las especies del Orden Squamata (Escamoso) han comenzado a aparecer con cierta frecuencia, aún mínima, en las investigaciones, según lo registrado en la literatura científica. Tanto los estudios de campo como los de laboratorio con ciertas especies, han mostrado efectos adversos tanto letales como sub-letales en los individuos expuestos a los plaguicidas, y en concentraciones ambientalmente relevantes (Weir *et al.*, 2015; Mingo, 2018). Esos efectos adversos refieren dependencia de diferentes variables tales como el compuesto, la dosis o concentración, las vías y el tiempo de exposición a los plaguicidas.

Es importante destacar que hasta finalizar esta Tesis doctoral, en lo que hace a nuestro conocimiento, no existían datos reportados en la literatura científica sobre valoraciones de genotoxicidad inducida por plaguicidas en la iguana overa. Si bien el ensayo de MN y otras AN, como el EC no han sido validados aún bajo normas internacionales en especies silvestres, son ampliamente aceptados como metodologías para caracterizar daño a nivel celular y orgánico. A partir de nuestros recientes hallazgos, consideramos que se hace evidente su aplicabilidad con éxito en especies no mamíferas y, fundamentalmente en reptiles. La puesta a punto de las técnicas implicó ajustes metodológicos para el EC y, detalles y cuidados en la tinción para el ensayo de MN, así como para analizar la presencia de otras anomalías nucleares en los eritrocitos (enfoque citoma) (Aiassa *et al.*, 2014), tal como se comentó en los Capítulos II y III, oportunamente.

Considerando las condiciones y la población de iguana overa utilizada en el presente trabajo de Tesis, el seguimiento de la edad de los ejemplares permitió detectar variación en la tasa de daño genotóxico basal, mientras que se pudo inferir que el nido de origen o el sexo no ejercerían influencia en las variables analizadas. No obstante, cabe destacar algunos aspectos en torno a esto: los machos mostraron valores basales más altos que las hembras adultas, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellos. En cuanto a la comparación entre edades, los organismos de menor edad mostraron una FBMN más baja que los juveniles y adultos, sin diferencia significativa entre estos últimos. Estos hallazgos se asemejan a otros resultados en humanos publicados

previamente, donde se estableció que las FBMN observadas en niños recién nacidos fueron relativamente bajas en comparación con los adultos (Aiassa *et al.*, 2014). Por el contrario, el IDB mostró una disminución a medida que se incrementaba la edad de las iguanas. Es posible que estos resultados opuestos estén asociados a los distintos puntos finales que mide cada biomarcador. El ensayo cometa detecta lesiones primarias en distintos niveles que pueden o no ser reparadas, considerándose como indicador de daño directo al ADN. Mientras que la presencia de MN es indicador indirecto de daño al ADN que puede involucrar la estructura de los cromosomas, el aparato mitótico, la maquinaria asociada al proceso de división celular o incluso referir a una falla en el punto de control en la transición Metafase-Anafase en células proliferantes, por citar algunos eventos, lo que sugiere que los MN están asociados a eventos de inestabilidad genómica. Ambos ensayos evidencian daños a distinto nivel celular, por lo que manifiestan una sensibilidad diferencial.

Otro aspecto de los abordados en este trabajo de Tesis que merece un comentario es el hecho que la exposición a formulaciones de plaguicidas en forma individual así como la mezcla de estos *in ovo* y en condición semi-natural de ejemplares de la iguana overa en distintas etapas de desarrollo, permitió observar que, independientemente del mecanismo de acción que hayan utilizado, los compuestos fueron capaces de inducir efectos genotóxicos en los eritrocitos, por lo que no se rechaza la segunda hipótesis planteada para esta Tesis. La misma enunciaba que “las formulaciones de glifosato (Roundup®), endosulfán (Galgofan®) y cipermetrina (Atanor®) inducen alteraciones en el material genético de los ejemplares de *S. merianae* de corta edad como neonatos y juveniles por diferentes vías de exposición”. Esta información cobra importancia por ser los primeros datos de genotoxicidad inducida por plaguicidas en esta especie reptiliana. Por otra parte, los resultados también indicarían que la elección de la aplicación de los plaguicidas por topicación fue un método adecuado para el estudio propuesto en esta especie, fundamentalmente porque es poco invasivo en comparación con otros métodos que fueron utilizados en especies ovíparas.

En este contexto, ante los hallazgos obtenidos con este diseño experimental en iguana overa estamos en condiciones de afirmar que los estudios *in situ* en estos reptiles cobran una importancia que era totalmente desconocida hasta el momento de este trabajo. Cabe comentar que la experiencia

muestra que coexisten diferentes factores en los escenarios ambientales, donde la exposición real resulta difícil de replicar con exactitud en el laboratorio. Es así, que algunas observaciones son dignas de destacar como es el caso de los valores de genotoxicidad del conjunto de iguanas adultas muestreadas, que se mantuvieron similares en los años de muestreo sin diferencias entre los organismos expuestos y no expuestos (Tabla 5.5, Capítulo V). Esta ausencia de efectos observables podría ser indicativo de que las subpoblaciones de adultos silvestres estarían haciendo frente al contacto con los plaguicidas, instaurando ciertos mecanismos de tolerancia a los químicos, es decir, compensarían el nivel de exposición tolerando las condiciones de estrés local a través del tiempo, por su condición de longevos. Esta tolerancia que hoy proponemos para iguana overa podemos relacionarla con la que se evidenció en un monitoreo realizado en serpientes, donde se demostró que los animales con una alta actividad enzimática de desintoxicación podían sobrevivir mejor en los ecosistemas contaminados (Mitchelmore *et al.*, 2005). Por el contrario, los neonatos, sí evidenciaron daño genotóxico y el mismo varió entre los años muestreados. Los valores de ID más altos se observaron en el primer año y los menores en el tercer año de muestreo. En el caso de la FMN, los valores aumentaron desde el primer al tercer año de muestreo, y las distintas AN mostraron resultados variables entre los años muestreados con valores significativos en todas ellas, a excepción de EritA, en el primer y tercer año (Tabla 5.8, Capítulo V). Estos valores son comparables con los resultados obtenidos en los neonatos que fueron expuestos a la mezcla de los tres plaguicidas en condiciones de laboratorio (Capítulo III). Los resultados diferentes de genotoxicidad entre los animales adultos y neonatos nos llevan a no rechazar la cuarta hipótesis planteada.

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre el crecimiento de los animales expuestos a estos plaguicidas de amplia utilidad en nuestro país, fueron dispares en torno a la exposición. Así, la exposición *in ovo* a las altas concentraciones de RU generó un retardo en el crecimiento en la LHC y en el peso de los neonatos hasta los 3 meses de edad, al igual que la concentración más alta de la formulación de CIP que indujo un menor peso hasta los 9 meses de vida. Mientras que las demás concentraciones de las formulaciones de CIP y ENDO individuales y la mezcla de las 3 formulaciones parecerían no generar efectos observables sobre el crecimiento de los neonatos expuestos durante

su desarrollo embrionario. Resultados similares a estos últimos fueron observados en los juveniles expuestos a la mezcla en un escenario de simulación semi-natural durante 3 meses. Estas evidencias contribuyen a no rechazar la tercera hipótesis planteada para esta Tesis. Como ya fue comentado en el Capítulo IV, una explicación posible a la ausencia de efectos observables en el crecimiento puede atribuirse a que los neonatos y juveniles se encontraban en una fase de rápido crecimiento que desarrollarían hasta alcanzar un tamaño adecuado para evitar a los depredadores (Mitchelmore *et al.*, 2005). También es posible que las concentraciones aplicadas no hayan sido suficientes para causar en esta especie alteraciones observables en los procesos bioenergéticos subyacentes que involucran una asimilación de energía y gastos metabólicos asociados (Amaral *et al.*, 2012a). De esta experiencia inicial se desprende la idea de que harían falta estudios más prolongados o a diferentes concentraciones, en torno a la acción de las formulaciones sobre el metabolismo de los neonatos y juveniles de iguana overa. El monitoreo de adultos expuestos *in situ* tampoco mostró efectos observables en el crecimiento, por lo que es posible considerar que el crecimiento en esta especie longeva como punto final no tenga la sensibilidad suficiente para actuar de indicador útil para analizar el impacto de los plaguicidas.

No se puede dejar de mencionar que hubo limitaciones en la obtención de ciertos datos que podrían haber mejorado aún más la caracterización del daño observado, particularmente en los estudios ambientales. En ellos, quedó pendiente la medición de la concentración de los plaguicidas tanto en las muestras de sangre como en los restos de los huevos expuestos para cotejarlos con los resultados de genotoxicidad y analizar, por ejemplo, si existía una relación entre el grado de respuesta observable y la cantidad de plaguicida detectada. Lamentablemente, estos análisis no pudieron concretarse por falta de un laboratorio que llevara a cabo dichas determinaciones en matrices biológicas en nuestro país, en los tiempos requeridos para su presentación en esta Tesis doctoral.

Otro hallazgo importante es que luego de la exposición *in ovo*, se evidenció que la CF induce efectos genotóxicos a bajas concentraciones. Mientras que las dos concentraciones más altas (400 y 200 $\mu\text{g}/\text{huevo}$) testeadas en los primeros ensayos, indujeron una alta mortandad de embriones, mayor al

90% de lo esperado. Esto demostraría que *S. merianae* durante su estadio embrionario sería más sensible que *C. latirostris*, la especie reptiliana que fue tomada como referencia, además de otros vertebrados en los cuales se ha empleado la CF en distintas concentraciones como agente genotóxico. Por lo que la concentración adecuada de CF para estudios de exposición *in ovo* en la iguana overa corresponde a 100 µg/huevo.

En función de los resultados obtenidos en la presente Tesis, podemos afirmar que la primera hipótesis planteada “El ensayo de MN con enfoque citoma y el Ensayo Cometa presentan diferentes grados de sensibilidad para detectar el daño genotóxico en eritrocitos de *S. merianae*” no puede ser rechazada. El EC demostró tener una mayor sensibilidad sobre el ensayo de MN-citoma para detectar el nivel de daño al ADN inducido por los plaguicidas en las iguanas overas expuestas en las distintas condiciones estudiadas. El EC se ha utilizado en monitoreo biológico de genotoxicidad, pruebas ecológicas e investigaciones de enfermedades humanas y en diferentes evaluaciones de salud ocupacional, demostrando sensibilidad y eficiencia para medir el rango de respuestas celulares al daño del ADN (Andem *et al.*, 2013; Singh, 2018). La presencia de MN-citoma ha sido asociado a defectos genéticos en el mantenimiento del genoma, envejecimiento acelerado, daño genotóxico y algunas enfermedades degenerativas (Fenech *et al.*, 2011; Aiassa y Mañas, 2012).

La iguana overa demostró ser un buen modelo biológico para estudios *in vivo* en la evaluación genotóxica de xenobióticos presentes en los ambientes naturales donde habita. Así, se determinó que las formulaciones de GLIF, CIP y ENDO inducen daño genotóxico en neonatos y juveniles de *S. merianae*, considerando que los procesos biológicos de protección, detoxificación y reparación del daño en estos organismos de corta edad se encuentran en maduración y estarían funcionando con poca eficiencia. Estos resultados aportan nuevas evidencias a lo disponible en la bibliografía acerca de la importancia de considerar a las especies reptilianas en las evaluaciones de riesgo ambiental. Las iguanas que habitan áreas expuestas a plaguicidas podrían estar en permanente riesgo de sufrir alteraciones en sus sistemas biológicos como resultado de la exposición crónica a bajas concentraciones de plaguicidas durante todo su ciclo de vida, principalmente en un rango etario de

alta vulnerabilidad, que abarca desde los estadios embrionarios, e incluye de los neonatos hasta juveniles.

6.2. CONCLUSIONES FINALES

En función a los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral se proponen las siguientes conclusiones finales:

- ♣ En iguana overa, *S. merianae*, el EC y el ensayo de MN permitieron detectar variación en la tasa de daño genotóxico basal de acuerdo a la edad de los individuos, mientras que otros factores como el nido de origen o el sexo no habrían influido sobre los valores basales determinados en esta especie.
- ♣ Se demostró que ciertas concentraciones de las formulaciones comerciales a base de glifosato (Roundup®), endosulfán (Galgofan®) y cipermetrina (Atanor®) en forma individual o en mezcla, inducen daño genotóxico en neonatos y juveniles de *S. merianae*, probablemente debido a que los sistemas de protección, detoxificación y/o reparación del daño se encuentran aún en desarrollo y maduración en estos animales de corta edad, por lo que funcionarían con poca eficiencia.
- ♣ En la evaluación de la genotoxicidad inducida por los plaguicidas bajo estudio, el EC presentó una mayor sensibilidad que el ensayo de MN-citoma para detectar el daño genotóxico en eritrocitos de *S. merianae*.
- ♣ Los neonatos de *S. merianae* mostraron efectos negativos en el crecimiento durante el primer año de vida luego de la exposición a los formulados individuales durante el desarrollo embrionario. Mientras que los animales juveniles de *S. merianae* no mostraron efecto sobre el crecimiento luego de la exposición en forma semi-controlada a formulaciones de plaguicidas en concentraciones utilizadas a campo.
- ♣ El monitoreo *in situ* de las poblaciones silvestres de *S. merianae* expuestas ambientalmente a los plaguicidas evaluados mostró efectos genotóxicos en los neonatos de áreas expuestas

respecto de los de áreas no expuestas, con diferencias entre los años muestreados, evidenciados por los distintos biomarcadores analizados. En los animales adultos también se observaron efectos genotóxicos entre años muestreados mediante el ID y los NM.

- ♣ En las condiciones experimentales aplicadas, *S. merianae* demostró ser un modelo biológico adecuado para desarrollar estudios *in vivo* de evaluación genotóxica de posibles xenobióticos presentes en los ambientes naturales donde habita.

6.3. PERSPECTIVAS

Luego de esta primera experiencia queda pendiente, a ser considerada en futuras investigaciones, el biomonitoreo de iguanas juveniles, y continuar profundizando los estudios de monitoreo ambiental presentados en esta tesis, con la incorporación de otros biomarcadores y otros parámetros que permitan evaluar a distintos niveles y desde un enfoque más integral, el estado de salud de las poblaciones silvestres en su hábitat de distribución natural.

Este trabajo permite afirmar que es necesario concretar más estudios sobre los potenciales efectos de las mezclas de formulaciones comerciales de todo tipo de plaguicidas, fundamentalmente aquellos que posean CIP o GLIF como principios activos, conjuntamente con otros compuestos de uso masivo actual, puesto que quedó en evidencia que el efecto de las mezclas es altamente dañino para los organismos de la región donde se aplican los plaguicidas en forma constante. Estos y tantos otros resultados de diferentes estudios demuestran claramente que el daño inducido por las formulaciones comerciales, en la mayoría de los casos, supera al ejercido por sus principios activos, infiriendo que la presencia de componentes nocivos podría estar en los excipientes que generarían efecto geno y/o citotóxico aditivo (Larramendy *et al.*, 2010). En este sentido, se propone la incorporación en futuras investigaciones de ensayos con determinaciones analíticas de los compuestos utilizados. Además, es fundamental la realización de estudios toxicológicos que se centren en la investigación simultánea de varios puntos finales como la toxicidad en órganos diana y la toxicidad directa no diana como el estrés oxidativo, la alteración endocrina y la genotoxicidad a largo plazo (Tsatsakis *et al.*, 2017).

Si bien los sistemas utilizados en estudios *in vivo* contemplan una respuesta sistémica, que involucra la toxicocinética del agente, los resultados obtenidos en otros organismos no son suficientes para determinar el posible efecto que alcanzaría a los seres humanos que habitan o trabajan en la región de referencia. Se hace evidente la necesidad de diseñar baterías de ensayos que consideren varios niveles de análisis de daño de distinta complejidad y en distintos modelos biológicos para lograr una mejor aproximación a la evaluación de la capacidad genotóxica del agente en particular en el caso de la población humana como posible blanco de exposición.

Por otro lado, el conocimiento en manos de científicos no es suficiente para atacar esta problemática de consecuencias económico-sociales sanitarias. Se requiere de la implementación de una gestión integrada desde la fabricación, el uso y manejo de los plaguicidas hasta el tratamiento adecuado de sus envases que involucre tanto a empresas, gobiernos, autoridades reguladoras como a los encargados de formular políticas, de manera de establecer pautas que conduzcan a preservar a las especies silvestres, el ecosistema en sí mismo y, en consecuencia, la salud pública de la región donde se aplican estos tratamientos a base de mezclas plaguicidas. Por lo que es importante centrar la atención en los posibles ámbitos donde los informes técnicos pueden constituirse en valiosa información para organizar campañas de concientización sobre el uso regulado de plaguicidas, en la búsqueda de cambios sustanciales a favor de una reducción de las dosis aplicadas o incluso la propuesta de reemplazar este sistema por otro que evite el uso de formulados con acción química de efectos desconocidos, en pos de mejorar nuestras vidas, proteger la biodiversidad y promover el mantenimiento de un equilibrio imprescindible en la naturaleza que garantice la supervivencia saludable de los ecosistemas y todos sus componentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Hamid, M., Moustafa, N., Mawgoud Abd Alla Asran, A. E., y Mowafy, L. (2017) Cypermethrin-induced histopathological, ultrastructural and biochemical changes in liver of albino rats: The protective role of propolis and curcumin, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6 (2), pp.: 160-173.
- Addy-Orduna, L. M., Brodeur, J. C., y Mateo, R. (2019) Oral acute toxicity of imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin in eared doves: A contribution for the risk assessment of neonicotinoids in birds, *Science of the Total Environment*, 650, pp.: 1216-1223.
- Agostini, M. G., Natale, G. S., y Ronco, A. E. (2010) Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles, *Ecotoxicology*, 19 (8), pp.: 1545-1550.
- Ahmad, K. R., Shehry, K., Raees, K., Kanwal, M. A., Abbas, T., y Ullah, A. (2018) Adverse Effects of Cypermethrin on the Chick (*Galus domesticus*) Development are Reversed by Co-Treatment with Vitamin E and Olive Oil, *Pakistan Veterinary Journal*, 38 (01), pp.: 46-50.
- Aiassa, D. (2012) ¿Qué son y qué características tienen los plaguicidas?, en: Aiassa, D., Bosch, B. y F. J. Mañas (ed.) *Plaguicidas a la carta: daño genético y otros riesgos*. 1ª. Córdoba, Argentina: Miguel Ángel Tréspidi Ediciones, pp.: 11-28.
- Aiassa, D., Mañas, F., Bernardi, N., Gentile, N., Méndez, A., Roma, D., y Gorla, N. (2014) Monitoreo de genotoxicidad en personas expuestas a plaguicidas. Estudio preliminar en niños, *Revista Cuestiones de Población y Sociedad*, 4 (4), pp.: 73-84.
- Aiassa, D. y Mañas, F. (2012) Biomarkers of Genetic Damage in Human Populations, *Acta Biológica Colombiana*. Universidad Nacional de Colombia, 17 (3), pp.: 485-510.
- Akoto, O., Oppong-Otoo, J., y Osei-Fosu, P. (2015) Carcinogenic and non-carcinogenic risk of organochlorine pesticide residues in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in Ghana, *Chemosphere*, 132, pp.: 193-199.
- Aldridge, W. N. (1996) *Mechanisms and Concepts in Toxicology*. CRC Press.
- Alegria, H. A., Wong, F., Jantunen, L. M., Bidleman, T. F., Figueroa, M. S., Bouchot, G. G., Moreno, V. C., Waliszewski, S. M., y Infanzon, R. (2008) Organochlorine pesticides and PCBs in air of southern Mexico (2002–2004), *Atmospheric Environment*, 42 (38), pp.: 8810-8818.
- Alexander, A. C., Luiker, E., Finley, M., y Culp, J. M. (2016) Mesocosm and Field Toxicity Testing in the Marine Context, en: Blasco *et al.* (eds.) *Marine Ecotoxicology*. Elsevier. pp.: 239-256.
- Ali, D., Nagpure, N. S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., y Lakra, W. S. (2009) Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis, *Food and Chemical Toxicology*, 47 (3), pp.: 650-656.
- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Agustina Etchegoyen, M., y Marino, D. J. (2018) Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina, *Science of the Total Environment*, 645, pp.: 89-96.
- Alves-pimenta, S., Félix, L., Colaço, B., Oliveira, P. A., y Venâncio, C. (2018 a) Teratology Study Guidelines: An Overview, en: Félix, L. (ed.) *Teratogenicity Testing. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY.
- Alves-Pimenta, S., Colaço, B., Oliveira, P. A., y Venâncio, C. (2018 b) Biological concerns on the

- selection of animal models for teratogenic testing, en: Félix, L. (ed.) *Teratogenicity Testing. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, pp.: 61-93.
- Amaral, M. J., Sanchez-Hernandez, J. C., Bicho, R. C., Carretero, M. A., Valente, R., Faustino, A. M. R., Soares, A. M. V. M., y Mann, R. M. (2012a) Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (10), pp.: 2345-2353.
- Amaral, M. J., Bicho, R. C., Carretero, M. A., Sanchez-Hernandez, J. C., Faustino, A. M. R., Soares, A. M. V. M., y Mann, R. M. (2012b) The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: Part 2 - Biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards, *Chemosphere*, 87 (7), pp.: 765-774.
- Amaral, M. J., Bicho, R. C., Carretero, M. A., Sanchez-Hernandez, J. C., Faustino, A. M. R., Soares, A. M. V. M., y Mann, R. M. (2012c) The usefulness of mesocosms for ecotoxicity testing with lacertid lizards, *Acta Herpetologica*, 7 (2), pp.: 263-280.
- Ambreen, F. y Javed, M. (2018) Pesticide mixture induced DNA damage in peripheral blood erythrocytes of freshwater fish, *Oreochromis niloticus*, *Pakistan Journal of Zoology*, 50 (1), pp.: 339-346.
- Andem, A. B., Agbor, R. B., y Ekpo, I. A. (2013) Review on Comet Assay: A reliable Tool for assessing DNA damage in animal models, *Journal of Current Research in Science*, 1 (6), pp.: 405-427.
- Andleeb, S. (2016) Teratogenic potential of pyrethroids: a review, *Punjab University Journal of Zoology*, 31 (1), pp.: 107-125.
- Andrade, D. V., Brito, S. P., Toledo, L. F., y Abe, A. S. (2004) Seasonal changes in blood oxygen transport and acid-base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae*, *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 140 (2), pp.: 197-208.
- Annett, R., Habibi, H. R., y Hontela, A. (2014) Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment, *Journal of Applied Toxicology*, 34 (5), pp.: 458-479.
- Ansoar-Rodríguez, Y., Fontanetti, C. S., Christofolletti, C. A., y Díaz-llera, C. (2015) Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46 (1), pp.: 51-62.
- Anwar, K. (2003) Toxic effect of cypermethrin on the biochemistry and morphology of 11th day chick embryo (*Gallus domesticus*), *Pakistan Journal of Applied Sciences*, 3 (6), pp.: 432-445.
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., y Costa, J. L. (2013) Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins, *Chemosphere*, 93 (9), pp.: 1866-1873.
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Guijarro, K. H., Pérez, D., Portocarrero, R., y Vidal, C. (2015) *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente*, INTA Ediciones. Argentina.
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., de Carvalho, R. F., de Souza, E. B., y de Cassia Stocco, R. (2015) Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, pp.: 74-82.
- Arias, S., Moya, M., y Souza, J. (2005) Transformaciones en la estructura agraria de la región pampeana causada por el proceso de agriculturización de la década de los '90, el uso de Glifosato y la aparición de malezas resistentes. *Estudio del caso de los productores de la localidad de Morse. Partido de Junín (provincia de Buenos Aires)*.
- Arolfo, R. V., Bedano, J. C., y Becker, A. R. (2010) Efectos del cultivo de soja transgénica en siembra

- directa sobre la taxocenosis de ácaros edáficos en Haplustoles del Centro de Córdoba, *Ciencia del Suelo*, 28 (2), pp.: 191-200.
- Arukwe, A., Myburgh, J., Langberg, H. A., Adeogun, A. O., Braa, I. G., Moeder, M., Schlenk, D., Crago, J. P., Regoli, F., y Botha, C. (2016) Developmental alterations and endocrine-disruptive responses in farmed Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) exposed to contaminants from the Crocodile River, South Africa, *Aquatic Toxicology*, 173, pp.: 83-93.
- Assayed, M. E., Khalaf, A. A., y Salem, H. A. (2010) Protective effects of garlic extract and vitamin C against *in vivo* cypermethrin-induced teratogenic effects in rat offspring, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (11), pp.: 3153-3158.
- Astiz, M., Arnal, N., de Alaniz, M. J. T., y Marra, C. A. (2011) Occupational exposure characterization in professional sprayers: Clinical utility of oxidative stress biomarkers, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32 (2), pp.: 249-258.
- Astoviza, M. J., Cappelletti, N., Bilos, C., Migoya, M. C., y Colombo, J. C. (2016) Massive airborne Endosulfan inputs related to intensive agriculture in Argentina's Pampa, *Chemosphere*, 144, pp.: 1459-1466.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenkhusen, M. C., Junges, C. M., y Basso, A. (2014) Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina, *Environmental monitoring and assessment*, 186 (1), pp.: 635-49.
- Avigliano, L., Fassiano, A. V., Medesani, D. A., Ríos De Molina, M. C., y Rodríguez, E. M. (2014) Effects of glyphosate on growth rate, metabolic rate and energy reserves of early juvenile crayfish, *Cherax quadricarinatus* M., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92 (6), pp.: 631-635.
- Avila-Pires, T. C. S. (1995) Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata), *Zoologische verhandelingen*, 299 (1), pp.: 1-704. doi: urn:nbn:nl:ui:19-317788.
- Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., Sallette, J., Soussaline, F., y Collins, A. (2011) The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay, *Mutagenesis*, 26 (3), pp.: 393-399.
- Azqueta, A., Shaposhnikov, S., y Collins, A. R. (2009) DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay, *Mutation Research*, 674 (1-2), pp.: 101-8.
- Babalola, O. O., Truter, J. C., y Wyk, J. H. (2019) Mortality, teratogenicity and growth inhibition of three glyphosate formulations using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus, *Journal of Applied Toxicology*, pp.: jat.3811.
- Bacchetta, C., Ale, A., Simoniello, M. F., Gervasio, S., Davico, C., Rossi, A. S., Desimone, M. F., Poletta, G. L., López, G., Monserrat, J. M., y Cazenave, J. (2017) Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles, *Ecological Indicators*, 76, pp.: 230-239.
- Baessee, C. Q., Tolentino, V. C. de M., Silva, A. M. da, Silva, A. de A., Ferreira, G. Â., Paniago, L. P. M., Nepomuceno, J. C., y Melo, C. de (2015) Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, pp.: 223-228.
- Bajpayee, M., Pandey, A. K., Zaidi, S., Musarrat, J., Parmar, D., Mathur, N., Seth, P. K., y Dhawan, A. (2006) DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, pp.: 682-692.
- Bakou, K., Stephanou, G., Andrianopoulos, C., y Demopoulos, N. A. (2002) Spontaneous and spindle poison-induced micronuclei and chromosome non-disjunction in cytokinesis-blocked

- lymphocytes from two age groups of women, *Mutagenesis*, 17 (3), pp.: 233-239.
- Balbuena, M. S., Tison, L., Hahn, M.-L., Greggers, U., Menzel, R., y Farina, W. M. (2015) Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation, *Journal of Experimental Biology*, 218 (17), pp.: 2799-2805.
- Bamigboye, A. Y., Adepoju, O. T., y Olalude, C. B. (2017) Assessment of Dichlorvos and Endosulfan Pesticide Residue Levels in Selected Fruits and Vegetables Sold in Some Major Markets in Ibadan, Oyo State, Nigeria, *Current Journal of Applied Science and Technology*, 22 (5), pp.: 1-6.
- Barata, C., Fabregat, M. C., Cotín, J., Huertas, D., Solé, M., Quirós, L., Sanpera, C., Jover, L., Ruiz, X., Grimalt, J. O., y Piña, B. (2010) Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain), *Environmental Pollution*, 158 (3), pp.: 704-710.
- Bárcenas-Ibarra, A., de la Cueva, H., Rojas-Lleonart, I., Abreu-Grobois, F. A., Lozano-Guzmán, R. I., Cuevas, E., y García-Gasca, A. (2015) First approximation to congenital malformation rates in embryos and hatchlings of sea turtles, *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 103 (3), pp.: 203-224.
- Barraco, L. A. (2015) Risk Assessment of the Nonnative Argentine Black and White Tegu, *Salvator merianae*, in South Florida. Tesis de Maestría, Florida Atlantic University.
- Barral, M. P., Herrera, L. P., Blanco, D. E., y Panigatti, J. L. (2013) *Biocombustibles en Argentina, impactos de la producción de soja sobre los humedales y el agua*. Wetlands International, pp.: 104. ISBN: 9789872471088
- Barrett, K. y Jaward, F. M. (2012) A review of endosulfan, dichlorvos, diazinon, and diuron pesticides used in Jamaica, *International journal of environmental health research*, 22(6), pp.: 481-99.
- Baršienė, J., Rybakovas, A., Lang, T., Grygiel, W., Andreikenaite, L., y Michailovas, A. (2012) Risk of environmental genotoxicity in the Baltic Sea over the period of 2009-2011 assessed by micronuclei frequencies in blood erythrocytes of flounder (*Platichthys flesus*), herring (*Clupea harengus*) and eelpout (*Zoarces viviparus*), *Marine Environmental Research*, 77, pp.: 35-42.
- Barten, S. L. y Fleming, G. J. (2014) Current Herpetologic Husbandry and Products, en: Mader, D. R. y S. J. Divers (eds.) *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery*. Elsevier, pp.: 2-12.
- Battu, R. S., Sahoo, S. K., y Jyot, G. (2009) Persistence of Acephate and Cypermethrin on Cotton Leaves, Cottonseed, Lint and Soil, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82 (1), pp.: 124-128.
- Beedanagari, S., Vulimiri, S. V., Bhatia, S., y Mahadevan, B. (2014) Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility, en: Gupta, R. C. (ed.) *Biomarkers in toxicology*. USA: Elsevier Inc., pp.: 706-719.
- Bejarano González, F. (2008) Endosulfan, a Threat to the Health and Environment, en: Bejarano González, F. (ed.) *El endosulfan y sus alternativas en America Latina*. RAP-AL (Latin American Pesticide Action Network), pp.: 9-34.
- Bejarano González, F., Ramírez Muñoz, F., Souza Casadhino, J., Weber, J. M., Guadarrama Zugasti, C., Escamilla Prado, E., Beristáin Ruiz, B., Acosta, M., y Cárcamo, M. I. (2009) *El endosulfán y sus alternativas en América Latina*, pp.: 78.
- Beldomenico, P. M., Rey, F., Prado, W. S., Villarreal, J. C., Muñoz-de-Toro, M., y Luque, E. H. (2007) In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68 (2), pp.: 246-251.

- Benamú, M. a, Schneider, M. I., y Sánchez, N. E. (2010) Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory, *Chemosphere*, 78 (7), pp.: 871-6.
- Benbrook, C. M. (2019) How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides?, *Environmental Sciences Europe*, 31 (1).
- Benedetti, D., Lopes Alderete, B., De Souza, C. T., Ferraz Dias, J., Niekraszewicz, L., Cappetta, M., Martínez-López, W., y Da Silva, J. (2018) DNA damage and epigenetic alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides, *Mutagenesis*, 33 (1), pp.: 87-95.
- Bento, C. P. M., van der Hoeven, S., Yang, X., Riksen, M. M. J. P. M., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., y Geissen, V. (2019) Dynamics of glyphosate and AMPA in the soil surface layer of glyphosate-resistant crop cultivations in the loess Pampas of Argentina, *Environmental Pollution*, 244, pp.: 323-331.
- Bernardi, N., Gentile, N., Mañas, F., Méndez, A., Gorla, N., y Aiassa, D. (2015) Evaluación del nivel de daño en el material genético de niños de la provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas, *Archivos Argentinos de Pediatría*, 113 (2), pp.: 126-132.
- Betancur, L. A., Ocampo, R., y Ríos, L. A. (2015) La Problemática Del Endosulfán: Aspectos Químicos, Analíticos y Ambientales, *Luna Azul*, (40), pp.: 293-314.
- Bhilwade, H. N., Jayakumar, S., y Chaubey, R. C. (2014) Age-dependent changes in spontaneous frequency of micronucleated erythrocytes in bone marrow and DNA damage in peripheral blood of Swiss mice, *Mutation Research*, 770 (2015), pp.: 80-84.
- Bicho, R. C., Amaral, M. J., Faustino, A. M. R., Power, D. M., Rêma, A., Carretero, M. A., Soares, A. M. V. M., y Mann, R. M. (2013) Thyroid disruption in the lizard *Podarcis bocagei* exposed to a mixture of herbicides: a field study, *Ecotoxicology*, 22 (1), pp.: 156-65.
- Biga, L. M. y Blaustein, A. R. (2013) Variations in lethal and sublethal effects of cypermethrin among aquatic stages and species of anuran amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (12), pp.: 2855-2860.
- Blake, R. y Pallett, K. (2018) The environmental fate and ecotoxicity of glyphosate, *Outlooks on Pest Management*, 29(6), pp.: 266-269.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Dalpr, L., Ferrari, D., Migliore, L., y Padovam, P. (1997) Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 6 (4), pp.: 249-256.
- Bolognesi, C. y Hayashi, M. (2011) Micronucleus assay in aquatic animals, *Mutagenesis*, 26 (1), pp.: 205-213.
- Bolsa de Cereales (2019) *Cierre de Campaña en Bolsa de Cereales*. Disponible en: <http://www.bolsadecereales.com/ver-cierre-de-campana-105> (Accedido: 5 de septiembre de 2019).
- Bolsa de Cereales de Buenos Aires, D. E. A. (2018) *Análisis de la producción de granos en argentina*. Disponible en: <http://www.bolsadecereales.com/imagenes/informes/2018-07/57-estimacionesrse130618.pdf>
- Bonanse, R., Filippi, I., Wunderlin, D., Marino, D., y Amé, M. (2017) The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment, *Toxics*, 6 (1), pp.: 3.
- Bonanse, R. I., Marino, D. J. G., Bertrand, L., Wunderlin, D. A., y Amé, M. V. (2017) Tissue-specific bioconcentration and biotransformation of cypermethrin and chlorpyrifos in a native fish (*Jenynsia multidentata*) exposed to these insecticides singly and in mixtures, *Environmental*

- Toxicology and Chemistry*, 36 (7), pp.: 1764-1774.
- Bonassi, S. y Au, W. W. (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction, *Mutation Research*, pp.: 73-86.
- Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., y Colombo, A. (2018) A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*, *Aquatic Toxicology*, 195, pp.: 103-113.
- Bopp, S., Berggren, E., Kienzler, A., Van Der Linden, S., y Worth, A. (2015) *Scientific methodologies for the combined effects of chemicals - a survey and literature review*, EUR 27471 EN.
- Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., D'Andrea, M. F., y Sánchez, M. (2014) Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American toad *Rhinella arenarum*, *Chemosphere*, 112, pp.: 70-6.
- Brusick, D., Aardema, M., Kier, L. D., Kirkland, D. J., y Williams, G. (2016) Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid, *Critical Reviews in Toxicology*, 46(sup1), pp.: 56-74.
- Bulgaroni, V., Lombardo, P., Rivero-Osimani, V., Vera, B., Dulgerian, L., Cerbán, F., Rivero, V., Magnarelli, G., y Guiñazú, N. (2013) Environmental pesticide exposure modulates cytokines, arginase and ornithine decarboxylase expression in human placenta, *Reproductive Toxicology*. Pergamon, 39, pp.: 23-32.
- Burcham, P. C. (1999) Internal hazards: Baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism, *Mutation Research*, 443 (1-2), pp.: 11-36.
- Burella, P. M., Odetti, L. M., Simoniello, M. F., y Poletta, G. L. (2018) Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed *in ovo* to pesticide formulations, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161 (May), pp.: 437-443.
- Burggren, W., Crossley, D., Rogowitz, G., y Thompson, D. (2015) Clutch effects explain heart rate variation in embryonic frogs (Cave Coqui, *Eleutherodactylus cooki*), *Physiological and Biochemical Zoology*, 76 (5), pp.: 672-8.
- Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S. Y., Collins, A. R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T. S., Nakajima, M., Sasaki, Y. F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., y Hartmann, A. (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, 627 (1), pp.: 31-35.
- Burr, S. A. (2014) Cypermethrin, *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 1, pp.: 1120-1121.
- Butinof, M., Fernandez, R. A., Stimolo, M. I., Lantieri, M. J., Blanco, M., Machado, A. L., Franchini, G., Díaz, M. del P., Butinof, M., Fernandez, R. A., Stimolo, M. I., Lantieri, M. J., Blanco, M., Machado, A. L., Franchini, G., y Díaz, M. del P. (2015) Pesticide exposure and health conditions of terrestrial pesticide applicators in Córdoba Province, Argentina, *Cadernos de Saúde Pública*. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 31 (3), pp.: 633-646.
- Cabarcas-Montalvo, M., Olivero-Verbel, J., y Corrales-Aldana, H. (2012) Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and Iguana iguana living near coal mining areas in Colombia, *Science of the Total Environment*, 416, pp.: 208-214.
- Cabrera, A. L. (1976) Regiones fitogeográficas argentinas, *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. 1ª. ACME.
- Calado, A. M. y dos Anjos Pires, M. (2018) An Overview of Teratology, en: Félix, L. (ed.) *Teratogenicity Testing. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, pp.: 3-32.

- Caliani, I., Campani, T., Giannetti, M., Marsili, L., Casini, S., y Fossi, M. C. (2014) First application of comet assay in blood cells of Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*), *Marine environmental research*, 96, pp.: 68-72.
- Capriglione, T., De Iorio, S., Gay, F., Capaldo, A., Vaccaro, M. C., Morescalchi, M. A., y Laforgia, V. (2011) Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis, *Ecotoxicology*, 20 (4), pp.: 885-91.
- Carballo, M. A. y Mudry, M. D. (2006) Indicadores y marcadores biológicos, en Mudry, M. D. y Carballo, M. A. (eds.) *Genética Toxicológica*. Buenos Aires, Argentina: De los Cuatro Vientos Editorial, pp.: 83-108.
- Caride, A., Lafuente, A., y Cabaleiro, T. (2010) Endosulfan effects on pituitary hormone and both nitrosative and oxidative stress in pubertal male rats, *Toxicology Letters*, 197 (2), pp.: 106-112.
- Carmona, D. (2001) Plagas emergentes en siembra directa, *Visión Rural*.
- Carpenter, J. K., Monks, J. M., y Nelson, N. (2016) The effect of two glyphosate formulations on a small, diurnal lizard (*Oligosoma polychroma*), *Ecotoxicology*, 25 (3), pp.: 548-554.
- Carrasco, A. (2013) Efecto del glifosato en el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis* (Teratogénesis y glifosato). *Laboratorio de Embriología Molecular, manuscrito*.
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., y Myers, M. S. (1990) Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47 (3), pp.: 2123-2136.
- Carreira, S., Elena, A., y Meneghel, M. D. (2005) *Reptiles de Uruguay*, No. 598.1 (899) CAR.
- de Carvalho, M. P. N., Sant'Anna, S. S., Grego, K. F., de Campos Fonseca-Pinto, A. C. B., Lorigados, C. A. B., Queiroz-Hazarbassanov, N. G. T., y Catão-Dias, J. L. (2017) Microcomputed Tomographic, Morphometric, and Histopathologic Assessment of Congenital Bone Malformations in Two Neotropical Viperids, *Journal of Wildlife Diseases*, 53 (4), pp.: 2016-08-181.
- Carvalho, W. F., Franco, F. C., Godoy, F. R., Folador, D., Avelar, J. B., Nomura, F., Cruz, A. D. da, Sabóia-Morais, S. M. T. de, Bastos, R. P., y Silva, D. de M. (2018) Evaluation of Genotoxic and Mutagenic Effects of Glyphosate Roundup Original® in *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 Tadpoles, *South American Journal of Herpetology*, 13 (3), pp.: 220-229.
- CASAFE (2007) Generalidades, Herbicidas, Fertilizantes, en: CASAFE (ed.) *Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina*. 13.ª ed, pp.: 1-1068.
- CASAFE (2012) *Estadísticas*. Disponible en: [http://www.casafe.org/pdf/estadisticas/Informe Mercado Fitosanitario 2012.pdf](http://www.casafe.org/pdf/estadisticas/Informe_Mercado_Fitosanitario_2012.pdf).
- CASAFE (2015) *Posición de Casafe ante la categorización del glifosato por la IARC (International Agency for Research on Cancer)*. Disponible en: <http://www.casafe.org>
- CASAFE (2018) *Informe de mercado de fitosanitarios de 2016*, www.casafe.org/publicaciones. Disponible en: <https://www.casafe.org/pdf/2018/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitarios-2016.pdf> (Accedido: 8 de marzo de 2019).
- Casini, S., Caliani, I., Giannetti, M., Marsili, L., Maltese, S., Coppola, D., Bianchi, N., Campani, T., Ancora, S., Caruso, C., Furi, G., Parga, M., D'Agostino, A., y Fossi, M. C. (2018) First ecotoxicological assessment of *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) in the Mediterranean Sea using an integrated nondestructive protocol, *Science of the Total Environment*, 631-632, pp.: 1221-1233.
- de Castilhos Ghisi, N. y Cestari, M. M. (2013) Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) after short-term, environmentally low concentration

- exposure, *Environ Monit Assess*, 185 (4), pp.: 3201-3207.
- Castro, E. R. de y Galetti, M. (2004) Frugivory and seed dispersal by the tegu lizard *Tupinambis merianae* Reptilia: Teiidae, *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*. USP, 44 (6), pp.: 91-97.
- Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R., y Sofia, S. H. (2008) Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*, *Mutation Research*, 655 (1-2), pp.: 41-46.
- Cavaş, T. y Könen, S. (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, *Mutagenesis*, 22 (4), pp.: 263-268.
- Cavieres F, M. F. (2004) Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos: Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental, *Revista médica de Chile*. Sociedad Médica de Santiago, 132 (7), pp.: 873-879.
- Cedergreen, N. (2014) Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology, *PLoS ONE* 9 (5), pp.: e96580.
- Cemeli, E., Baumgartner, A., y Anderson, D. (2009) Antioxidants and the Comet assay, *Mutation Research*, 681 (1), pp.: 51-67.
- Cerrillo, I., Granada, A., López-Espinosa, M. J., Olmos, B., Jiménez, M., Caño, A., Olea, N., y Olea-Serrano, M. F. (2005) Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk, *Environmental Research*, 98 (2), pp.: 233-239.
- Ceyca, J. P., Torres-Bugarín, O., Castillo-Guerrero, J. A., y Betancourt-Lozano, M. (2014) Seabird embryos as biomonitors of micronucleogenic genotoxic agents: potential application for the coasts of Mexico, *Avian Biology Research*, 7 (4), pp.: 223-234.
- Chani, J. M., Cruz, F., Perrotti, G., Aguirre, M., y Rufino, S. (1993) Rol de la hembra de *Tupinambis teguixin* (Teiidae), durante la nidificación, *Acta Zoologica*, 151 (42), pp.: 295-299.
- Chen, G., Cao, P., y Liu, R. (2011) A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure, *Food Chemistry*, 125 (4), pp.: 1406-1411.
- Chen, L., Xu, P., Diao, J., Di, S., Li, R., y Zhou, Z. (2016) Distribution, Metabolism and Toxic Effects of Beta-Cypermethrin in Lizards (*Eremias argus*) Following Oral Administration, *Journal of Hazardous Materials*, 306, pp.: 87-94.
- Choudhary, N., Sharma, M., Verma, P., y Joshi, S. C. (2003) Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan, *Journal of Environmental Biology*, 24 (3), pp.: 305-308.
- Chowdhuri, D. K., Nazir, A., y Saxena, D. K. (2001) Effect of three chlorinated pesticides on hsr ω stress gene in transgenic *Drosophila melanogaster*, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15 (4), pp.: 173-186.
- Chung, I. K., Cheon, W. H., y Ku, S. K. (2011) Micronucleus test of picrorrhiza rhizoma aqueous extract in bone marrow cells of male icr mice, *Toxicological Research*, 27 (2), pp.: 119-123.
- Ciacci, C., Betti, M., Canonico, B., Citterio, B., Roch, P., y Canesi, L. (2010) Specificity of anti-Vibrio immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 105 (1), pp.: 49-55.
- Cid, R. (2014) Aplicación Eficiente de Fitosanitarios. Plaguicidas químicos, composición y formulaciones, etiquetado, clasificación toxicológica, residuos y métodos de aplicación | INTA :: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, en. INTA, Argentina.

- Clements, W. H. y Rohr, J. R. (2009) Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects, *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28 (9), pp.: 1789-1800.
- Collins, S. E. J. (2019) Agriculture and the Life Aquatic: Effects of Agricultural Landscape Structure on Farmland Aquatic Biodiversity and Water Quality. Tesis doctoral, Universidad de Carleton. Ottawa, Ontario
- Collins, A., Koppen, G., Valdiguiesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Muller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., y Bonassi, S. (2014) The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project, *Mutation Research*, pp.: 27-39.
- Collins, A. R. (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations, *Molecular Biotechnology*, 26(3), pp.: 249-261.
- Collins, A. R. (2014) Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay, *BBA - General Subjects*, 1840(2), pp.: 794-800.
- Conley, J. y Richards, S. (2013) Environmental Teratogenesis, en: Férard, J.-F. y C. Blaise (eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Dordrecht: Springer, pp.: 457-466.
- Conover, W. 1998. Practical nonparametrics Statistics. 3rd. Edition. John Wiley & Sons. Wiley Series in Probability and Statistics. USA.
- Cook, P. R., Brazell, I. A., y Jost, E. (1976) Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA, *Journal of cell science*, 22(2), pp.: 303-24.
- Cossu-Leguille, C. y Vasseur, P. (2013) Aquatic Biomarkers, en: Ferárd, J.-F. y C. Blaise (eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Netherlands, pp.: 49-66.
- Costa, L. G. (2008) Toxic effects of pesticides, en: Klaassen, C. D. (ed.) *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 7^a. McGraw-Hill Companies, Inc., pp.: 883-930.
- Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T., y Kalinin, A. L. (2008) Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original, *Ecotoxicology*, 17(3), pp.: 153-163.
- Cotelle, S. y Ferard, J. F. (1999) Review Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review, *Environmental and molecular Mutagenesis*, 34 (4), pp.: 246-255.
- Cox, C. y Surgan, M. (2006) Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health, *Environmental Health Perspectives*, 114 (12), pp.: 1803-1806.
- Cristaldi, M., Ieradi, L. A., Udrouiu, I., y Zilli, R. (2004) Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals, *Mutation Research*, 559 (1-2), pp.: 1-9.
- Crupkin, A. C., Carriquiriborde, P., Mendieta, J., Panzeri, A. M., Ballesteros, M. L., Miglioranza, K. S. B., y Menone, M. L. (2013) Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105 (2), pp.: 102-110.
- Cruz, F. B., Teisaire, E., Nieto, L., y Roldan, A. (1999) Reproductive Biology of Teius teyou in the Semiarid Chaco of Salta, Argentina, *Journal of Herpetology*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 33 (3), pp.: 420.
- Cuevas, N. y Zorita, I. (2018) Baseline levels of environmental genotoxicity and potential confounding factors using common sole (*Solea solea*) as sentinel organism, *Marine Environmental Research*, 138, pp.: 1-8.

- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Martinuzzi, C., Attademo, M. A., Seib, S., Simoniello, M. F., y Lajmanovich, R. C. (2017) Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press, 143, pp.: 62-71.
- Damgaard, I. N., Skakkebaek, N. E., Toppari, J., Virtanen, H. E., Shen, H., Schramm, K. W., Petersen, J. H., Jensen, T. K., Main, K. M., Boisen, K., Chellakooty, M., Schmidt, I., Kaleva, M., y Soumi, A. (2006) Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism, *Environmental Health Perspectives*, 114 (7), pp.: 1133-1138.
- Dar, S. A., Yousuf, A. R., Balkhi, M.-H., Ganai, F. A., y Bhat, F. A. (2015) Assessment of endosulfan induced genotoxicity and mutagenicity manifested by oxidative stress pathways in freshwater cyprinid fish crucian carp (*Carassius carassius* L.), *Chemosphere*, 120, pp.: 273-283.
- Dar, S. A., Yousuf, A. R., y Balkhi, M.-H. (2016) An introduction about Genotoxicology Methods as Tools for Monitoring Aquatic Ecosystem: Present status and Future perspectives, *Fisheries and Aquaculture Journal*, 07 (1), pp.: 1-11.
- Dass, S. B., Ali, S. F., Heflich, R. H., y Casciano, D. A. (1997) Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice, *Mutation Research*, 381 (1), pp.: 105-110.
- Davis, A. K. y Floyd, T. M. (2014) Evaluating levels of genotoxic stress in eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*) using the erythrocyte micronucleus assay, *Comparative Clinical Pathology*, 23 (5), pp.: 1189-1193.
- Demetrio, P. M. (2012) *Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana*. Tesis Docotral, Universidad Nacional de la Plata. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/18139> (Accedido: 3 de febrero de 2017).
- Demetrio, P. M., Bonetto, C., y Ronco, A. E. (2014) The effect of cypermethrin, chlorpyrifos, and glyphosate active ingredients and formulations on *Daphnia magna* (Straus), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93 (3), pp.: 268-73.
- Devine, G., Eza, D., Ogusuku, E., y Furlong, M. (2008) Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25 (1), pp.: 74-100.
- Di Fiori, E., Pizarro, H., dos Santos Afonso, M., y Cataldo, D. (2012) Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water, *Ecotoxicology and environmental safety*, 81, pp.: 106-113.
- Doherty, A. T. (2012) The *In Vitro* Micronucleus Assay, en: Parry, J. M. y E. M. Parry (eds.) *Genetic Toxicology*. Springer New York, pp.: 121-141.
- Donadio, O. y Gallardo, J. M. (1984) Biología y conservación de las especies del género *Tupinambis* (Squamata, Sauria, Teiidae) en Argentina, *Revista del Museo de Ciencias Naturales "Bernadino Rivadavia"*. 13.^a ed, pp.: 117-127.
- Donayo, P., Piña, C., y Larriera, A. (2002) Período de incubación, banda de calcificación peso de los huevos y desarrollo embrionario de *Caiman latirostris* a tres temperaturas diferentes, en: Verdade, L. M. y A. Larriera (eds.) *La conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América Latina*. 2.^a ed. Piracicaba, Sao Paulo, Brasil: C Editoria, pp.: 79-90.
- Dong, S., Liu, Y., Yu, C., Zhang, Z., Chen, M., y Wang, C. (2016) Investigating pollen and gene flow of WYMV-resistant transgenic wheat N12-1 using a dwarf male-sterile line as the pollen receptor, *PLoS ONE*, 11 (3), p.: e0151373.
- Douglas, J. W., Weiss, K., y Wardrop, J. (2010) *Schalm's veterinary hematology*, en: Douglas, J. W.; K.

- Weiss y J. Wardrop (Eds). 6th ed. USA: Wiley-Blackwell.
- Douros, D. L., Gaines, K. F., y Novak, J. M. (2015) Atrazine and glyphosate dynamics in a lotic ecosystem: the common snapping turtle as a sentinel species, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(3), pp.: 114.
- Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, 82, pp.: 47-95.
- Duarte Varela, C. F. y Cabrera, M. R. (2000) Testing skeletochronology in black tegu lizards (*Tupinambis merianae*) of known ages, *Herpetological Review*, 31 (4), pp.: 224-226.
- Duffus, J. H. (2006) Introduction to Toxicology, en Duffus, J.H. Worth, H. G. J. (ed.) *Fundamental Toxicology*. Norfolk, UK: The Royal Society of Chemistry, pp.: 1-16.
- Duke, S. O. y Powles, S. B. (2008) Glyphosate: A once-in-a-century herbicide, *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64 (4), pp.: 319-325.
- Eaton, D. L. y Gilbert, S. G. (2008) Principles of toxicology, en Klassen, C. D. (ed.) *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 7th editio. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, pp.: 11-43.
- EFSA (2009) Guidance of European Food Safety Authority: Risk Assessment for Birds and Mammals, *EFSA Journal*, 7(12), p.: 1438.
- Eisenreich, K. M. y Rowe, C. L. (2013) Experimental exposure of eggs to polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) and possible species-specific differences in debromination, *Environ. Toxicol. Chem.*, 32 (2), pp.: 393-400.
- Embrandiri, A., Singh, R. P., Ibrahim, H. M., y Khan, A. B. (2012) An epidemiological study on the health effects of Endosulfan spraying on Cashew plantations in Kasaragod district, Kerala, India, *Asian Journal of Epidemiology*, 5 (1), pp.: 22-31.
- Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., Márquez, A., Errico, E., Segura, A. M., Heinzen, H., y Pérez-Parada, A. (2018) Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems, *Science of the Total Environment*, 631-632, pp.: 169-179.
- Escribano, G., Castillo, S., Daher, V., Salazar, S., y Tobella, L. (2009) Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético, *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile*, 20, pp.: 20-27.
- Etchegoyen, M. A., Ronco, A. E., Almada, P., Abelando, M., y Marino, D. J. (2017) Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin, *Environmental Monitoring and Assessment*, 189 (2), p.: 63.
- Evans, H. J., Neary, G. J., y Williamson, F. S. (1959) The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on Vicia Faba Roots and the Effect of Oxygen, *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1 (3), pp.: 216-229.
- EXTOXNET (1996a) *Pesticide Information Profiles: Cypermethrin*. Disponible en: <http://extoxnet.orst.edu/pips/cypermeth.htm> (Accedido: 14 de enero de 2019).
- EXTOXNET (1996b) *Pesticide Information Profiles: Endosulfan*. Disponible en: <http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm> (Accedido: 14 de enero de 2019).
- EXTOXNET (1996c) *Pesticide Information Profiles: Glyphosate*. Disponible en: <http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm>.

- FAO (2013) *La soja ocupará 20 de las 34 millones de hectáreas sembradas en Argentina para 2013*.
- FAO (2018) *FAOSTAT Land Use domain*, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RL>.
- Faustman, E. M. y Omenn, G. S. (2008) Risk assessment, en: Klaassen, C. D. (ed.) *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 7th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., pp.: 107-128.
- Fenech, M. (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations, *Mutation Research*, 404 (1), pp.: 155-165.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique, *Mutation Research*, 455 (1-2), pp.: 81-95.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., y Thomas, P. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells, *Mutagenesis*, 26 (1), pp.: 125-132.
- Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W. P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., y Bonassi, S. (2011) The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future, *Mutagenesis*, 26 (1), pp.: 239-245.
- Fenech, M. y Bonassi, S. (2011) The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes, *Mutagenesis*, 26 (1), pp.: 43-9.
- Fenech, M. y Crott, J. W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutation Research*, 504 (1-2), pp.: 131-136.
- Fenech, M. F. y Morley, A. A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147, pp.: 29-36.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A. T. y Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which *in vivo* exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans. *Mutation Research*, 770, pp.: 12-25.
- Ferreira, F. S., Brito, S. V., Saraiva, R., Araruna, M. K., Menezes, I. R., Costa, J. G. M., Coutinho, H. D. M., Almeida, W. O., y Alves, R. R. N. (2010) Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*, *Journal of ethnopharmacology*, 130 (3), pp.: 514-20.
- Finkel, T. y Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, pp.: 239–247.
- Fishel, F. M. (2005) Pesticide Effects on Nontarget Organisms, *The Institute of Food and Agricultural Sciences Extension Service, University of Florida*, 85, p.: 6.
- Fitzgerald, L. A., Cook, J. A., y Aquino, A. L. (2006) Molecular Phylogenetics and Conservation of *Tupinambis* (Sauria: Teiidae), *Copeia*, 1999 (4), p.: 894.
- Fitzgerald, L. A., Porini, G., y Lichtschein, V. (1994) El manejo de *Tupinambis* en Argentina: Historia, estado actual y perspectivas futuras, *Interciencia*, 19 (4), pp.: 166-170.
- Frenzilli, G., Nigro, M., y Lyons, B. P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments, *Mutation Research*, 681 (1), pp.: 80-92.
- Frossard, A., Leite, F. L. G., Silva, E. L. F., Carneiro, M. T. W. D., Júnior, J. L. R., Gomes, L. C., y Endringer,

- D. C. (2019) The snake *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) is a suitable bioindicator of environmental exposure to cadmium: An experimental study, *Ecological Indicators*, 104, pp.: 166-171.
- Furnus, G., Caffetti, J., García, E., Benítez, M., Pastori, M., Fenocchio, A., Furnus, G., Caffetti, J., García, E., Benítez, M., Pastori, M., y Fenocchio, A. (2014) Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina), *Brazilian Journal of Biology*, 74 (1), pp.: 217-221.
- Gaikwad, A. S., Karunamoorthy, P., Kondhalkar, S. J., Ambikapathy, M., y Beerappa, R. (2015) Assessment of hematological, biochemical effects and genotoxicity among pesticide sprayers in grape garden, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 10 (11), pp.: 2-6.
- Gajski, G., Gerić, M., Oreščanin, V., y Garaj-Vrhovac, V. (2018) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in peripheral blood lymphocytes of the general population: Contribution of age, sex, seasonal variations and lifestyle factors, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, pp.: 561-570.
- Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., Pourrut, B., Del Bo, C., Novak, M., Sramkova, M., Milić, M., Bjerve Gutzkow, K., Costa, S., Dusinska, M., Brunborg, G., y Collins, A. (2019) The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates), *Mutation Research*, 779, pp.: 82-113.
- Gajski, G., Žegura, B., Ladeira, C., Pourrut, B., Del Bo, C., Novak, M., Sramkova, M., Milić, M., Gutzkow, K. B., Costa, S., Dusinska, M., Brunborg, G., y Collins, A. (2019) The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates), *Mutation Research*, 779, pp.: 82-113.
- Gaupp-Berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B., y Zaller, J. G. (2015) Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations, *Scientific Reports*, 5 (1), pp.: 12886.
- Gebhardt, D. O. E. (1970) The embryo-lethal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryos, *Teratology*, 3 (3), pp.: 273-278.
- Gendron, A. (2013) Amphibian Ecotoxicology, en: Féraud, J.-F. y Blaise, C. (eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Netherlands, pp.: 21-38.
- Gianessi, L. P. y Reigner, N. P. (2007) The Value of Herbicides in U.S. Crop Production, *Weed Technology*, 21 (2), pp.: 559-566.
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., y Girdhar, M. (2018) Glyphosate toxicity for animals, *Environmental Chemistry Letters*, 16 (2), pp.: 401-426.
- Glynn, P. (2003) NTE: One target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms?, *BioEssays*. John Wiley & Sons, Ltd, 25 (8), pp.: 742-745.
- Gomes, B. D. F. (2015) *Efeitos da dieta e ontogenia no crescimento e fisiologia digestiva do lagarto Teiu, Tupinambis Merianae*. Universidade Estadual Paulista.
- Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Martínez-Arroyo, A.-P., Calderón-Segura, M. E., Villalobos-Pietrini, R., y Waliszewski, S. M. (2013) Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, pp.: 159-180.
- Gonçalves, M. W., Gambale, P. G., Godoy, F. R., Alves, A. A., Rezende, P. H. de A., Cruz, A. D. da, Maciel, N. M., Nomura, F., Bastos, R., de Marco-Jr, P., y Silva, D. de M. (2017) The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay, *Zoologia*, 34, pp.: 1-8.
- Gonsebatt, M. E. (2006) El ensayo de micronúcleos en tejidos epiteliales y su uso en la evaluación de

- efectos genotóxicos, en: Mudry, M. D. y Carballo, M. A. (eds.) *Genética Toxicológica*. 1ra ed. Buenos Aires, Argentina: De los Cuatro Vientos Editorial, pp.: 299-316.
- González Aguilera, C., Cruz, J., y Alfaro Mendoza, R. (2015) Physiological response of alligator gar juveniles (*Atractosteus spatula*) exposed to sub-lethal doses of pollutants, *Fish Physiology and Biochemistry*, 41 (4), pp.: 1015-1027.
- González, N. V., Molinari, G., Soloneski, S., y Larramendy, M. L. (2008) Genotoxicidad y citotoxicidad de pesticidas. Evaluación de los principios activos y formulaciones comerciales usadas en Argentina, *Theoria*, 17 (2), pp.: 27-45.
- Grue, C. E., Gardner, S. C., y Gibert, P. L. (2002) On the significance of pollutant-induced alterations in the behaviour of fish and wildlife, en: Dell’Omo, G. (ed.) *Behavioural ecotoxicology*. Wiley, Chichester: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, pp.: 1-90.
- Grunfeld, H. T. y Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2004) Effect of *in vitro* estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels, *Toxicology Letters*, 151 (3), pp.: 467-480.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. a, y Pacheco, M. (2010) European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®-a glyphosate-based herbicide, *Mutagenesis*, 25 (5), pp.: 523-30.
- Guilherme, S., Santos, M. A., Gaivão, I., y Pacheco, M. (2014) Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure?, *Aquatic Toxicology*, 155, pp.: 213-221.
- Guirlet, E., Das, K., Thomé, J. P., y Girondot, M. (2010) Maternal transfer of chlorinated contaminants in the leatherback turtles, *Derموchelys coriacea*, nesting in French Guiana, *Chemosphere*, 79 (7), pp.: 720-726.
- Guo, F.-Z., Zhang, L.-S., Wei, J.-L., Li, Y.-B., Shi, Z.-X., Yang, Y.-M., Zhou, X.-Q., y Sun, Z.-W. (2015) Endosulfan induced the arrest of the cell cycle through inhibiting the signal pathway mediated by PKC- α and damaging the cytoskeleton in spermatogonial cells of mice *in vitro*, *Toxicology Research*, 4 (2), pp.: 508-518.
- Guo, X., Ni, J., Liang, Z., Xue, J., Fenech, M. F., y Wang, X. (2019) The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem, *Mutation Research*, 779, pp.: 1-35.
- Gupta, P. K. y Gupta, R. C. (1979) Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan. A review, *Toxicology*, 13, pp.: 115-130.
- Gupta, R. C. (2014) Introduction, en: Gupta, R. C. (ed.) *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, USA-UK, pp.: 1128.
- Gupta, R. C. y Milatovic, D. (2014) Insecticides, en: Gupta, R. C. (ed.) *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, USA-UK, pp.: 1128.
- Gupta, V. K. y Ali, I. (2008) Removal of endosulfan and methoxychlor from water on carbon slurry, *Environmental Science and Technology*, 42 (3), pp.: 766-770.
- Hall, B. J. (1978) Notes on the husbandry, behaviour and breeding of captive tegu lizards, *International Zoo Yearbook*, 18 (1), pp.: 91-95.
- Hall, R. J. (1980) Effects of environmental contaminants on reptiles: A review, *Special scientific report wildlife Nro. 228*, United States Dept. of Interior, Fish and Wildlife Service, pp.: 1-12.
- Hall, R. J. y Henry, P. F. P. (1992) Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs, *Herpetological Journal*, 2, pp.: 65-71.

- Harikrishnan, V. R. y Usha, S. (2004) *Endosulfan: Argumentos para su prohibición, IPEN Pesticide Working Group Project*. Kerala, India.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., y Tice, R. R. (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, 18 (1), pp.: 45-51.
- Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., y Mueller, L. (2004) Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis*, 19(1), pp.: 51-59.
- Harvey, M. B., Ugueto, G. N., y Gutberlet, R. L. (2012) Review of Teiid Morphology with a Revised Taxonomy and Phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata), en *Zootaxa 3459*. Magnolia Press. Auckland, New Zealand, pp.: 1-156.
- Hayashi, M. (2016) The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test, *Genes and Environment*, 38(1), pp.: 4-9.
- Hayretdağ, S., Mert, G., Yakin, B. Y., y Tok, C. V. (2014) A preliminary study on micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of some Colubrid snakes from Turkey, *Biharean Biologist*, 8(1), pp.: 53-55.
- Heddle, J. A. (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research*, 18(2), pp.: 187-190.
- Hegazi, W. H. (2002) *Toxicological studies for some pesticides on economic pests*. Faculty of Agriculture, Kafrelsheikh University.
- Helander, M., Saloniemi, I., Omacini, M., Druille, M., Salminen, J. P., y Saikkonen, K. (2018) Decreases mycorrhizal colonization and affects plant-soil feedback, *Science of the Total Environment*. Elsevier, 642, pp.: 285-291.
- Hernández, A. F., Gil, F., y Lacasaña, M. (2017) Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update, *Archives of Toxicology*, 91 (10), pp.: 3211-3223.
- Heuser, V. D., Da Silva, J., Moriske, H. J., Dias, J. F., Yoneama, M. L., y De Freitas, T. R. O. (2002) Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40 (4), pp.: 227-235.
- Heuser, V. D., de Andrade, V. M., Peres, A., Gomes de M. B., L. M., y Bogo Chies, J. A. (2008) Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells, *Cell biology international*, 32 (10), pp.: 1223-9.
- Hii, Y. S., Lee, M. Y., y Chuah, T. S. (2007) Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behaviour and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89 (1), pp.: 46-53.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., y Fenech, M. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutation Research*, 659(1-2), pp.: 93-108.
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A. M., Oostingh, G. J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H. R., Loureiro, S., Soares, A. M. V. M., Ferreira, A. L. G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P. E., Bayley, M., Svendsen, C., y Spurgeon, D. J. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review, *Science of the Total Environment*, 408(18), pp.: 3746-3762.
- Hopkins, W. A. (2000) Letter to the Editor, Reptile Toxicology: Challenges and Opportunities on the

- last front *Frontier in Vertebrate Ecotoxicology, Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (10), pp.: 2391-2393.
- Hopkins, W. A. (2006) Use of tissue residues in reptile ecotoxicology: a call for integration and experimentalism, en: Gardner, S. C. M. y E. Oberdorster (eds.) *Toxicology of reptiles*, pp.: 35-62.
- Hu, J., Zhang, Z., Wei, Q., Zhen, H., Zhao, Y., Peng, H., Wan, Y., Giesy, J. P., Li, L., y Zhang, B. (2009) Malformations of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, and its causal agent, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (23), pp.: 9339-9344.
- IARC (2015) Some Organophosphate Insecticides and Herbicides, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 112. Disponible en: <https://publications.iarc.fr/549>.
- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A., y Orsière, T. (2008) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature, *Mutation Research*, 658 (3), pp.: 215-233.
- Ismail, B. S., Mazlinda, M., y Zuriati, Z. (2012) Effects of temperature, soil moisture content and soil type on the degradation of cypermethrin in two types of Malaysian agricultural soils, *World Applied Sciences Journal*, 17 (4), pp.: 428-432.
- Iturburu, F. G., Bertrand, L., Mendieta, J. R., Amé, M. V., y Menone, M. L. (2018) An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts: Oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid, *Ecological Indicators*, 93, pp.: 351-357.
- Iturburu, F. G., Simoniello, M. F., Medici, S., Panzeri, A. M., y Menone, M. L. (2018) Imidacloprid Causes DNA Damage in Fish: Clastogenesis as a Mechanism of Genotoxicity, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(6), pp.: 760-764.
- Izaguirre, M. F., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Soler, A. P., y Casco, V. H. (2000) Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(4), pp.: 501-507.
- Jachetta, J. J., Appleby, A. P., y Boersma, L. (1986) Apoplastic and symplastic pathways of atrazine and glyphosate transport in shoots of seedling sunflower, *Plant physiology*, 82(4), pp.: 1000-1007.
- Jackson, A. L. y Loeb, L. A. (2001) The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer, *Mutation Research*, 477 (1-2), pp.: 7-21.
- Jenkins-Perez, J. (2012) Hematologic Evaluation of Reptiles: A Diagnostic Mainstay, *Veterinary technician*, 33 (8), pp.: 1-8.
- Jha, A. N. (1998) Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies, *Mutation Research*, 399 (1), pp.: 1-2.
- Jha, A. N. (2004) Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview, *Mutation Research*, 552 (1-2), pp.: 1-17.
- Jones, D. K., Hua, J., y Relyea, R. A. (2016) Effects of endosulfan in freshwater pond communities, *Freshwater Science*, 35 (1), pp.: 152-163.
- Kahl, V. F. S., Simon, D., Salvador, M., Branco, C. dos S., Dias, J. F., da Silva, F. R., de Souza, C. T., y da Silva, J. (2016) Telomere measurement in individuals occupationally exposed to pesticide mixtures in tobacco fields, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 57 (1), pp.: 74-84.
- Kiefer, M. C. y Sazima, I. (2002) Diet of juvenile tegu lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae) in southeastern Brazil, *Amphibia-Reptilia*, 23, pp.: 105-108.
- Kienzler, A., Bopp, S. K., van der Linden, S., Berggren, E., y Worth, A. (2016) Regulatory assessment of

- chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, pp.: 321-334.
- Kier, L. D. y Kirkland, D. J. (2013) Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations., *Critical reviews in toxicology*, 43 (4), pp.: 283-315.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., y Wakata, A. (2003) Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, *Mutation Research*, 540 (2), pp.: 153-163.
- Kittle, R. P., McDermid, K. J., Muehlstein, L., y Balazs, G. H. (2018) Effects of glyphosate herbicide on the gastrointestinal microflora of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) Linnaeus, *Marine Pollution Bulletin*, 127, pp.: 170-174.
- Klassen, C. D., Amdur, M. O., y Doull, J. (2008) *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 7th Ed., *Toxicology*. Klassen, C. D. (Ed.). McGraw-Hill Companies, Inc. 7th Ed.
- Kleinow, K., Baker, J., Nichols, J., Gobas, F., Parkerton, T., Muir, D., Monteverdi, G., y Mastrodone, P. (1999) Exposure, Uptake, and Disposition of Chemicals in Reproductive and Developmental Stages of Selected Oviparous Vertebrates, en: Di Giulio, R. T. y D. E. Tillitt (eds.) *Reproductive and Developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), pp.: 9-111.
- Kleinsasser, N. H., Wallner, B. C., Harréus, U. A., Kleinjung, T., Folwaczny, M., Hickel, R., Kehe, K., y Reichl, F.-X. (2004) Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay, *Journal of Dentistry*, 32 (3), pp.: 229-234.
- Knopper, L. D. (2005) *Use of the comet assay to assess genotoxicity in mammalian, avian, and amphibian species*, *Technical Report Series No. 429*. Ottawa, ON, Canada.
- Köhler, H.-R. y Triebkorn, R. (2013) Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?, *Science (New York, N.Y.)*, 341(6147), pp.: 759-65.
- Kollman, W. y Segawa, R. (1995) Interim Report of the Pesticide Chemistry Database, *Environmental Hazards Assessment Program. California Department of Pesticide Regulation*.
- Kolpin, D. W., Thurman, E. M., Lee, E. A., Meyer, M. T., Furlong, E. T., y Glassmeyer, S. T. (2006) Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States, *Science of the Total Environment*, 354 (2-3), pp.: 191-197.
- Kong, L., Zhang, Y., Zhu, L., Wang, Jinhua, Wang, Jun, Du, Z., y Zhang, C. (2018) Influence of isolated bacterial strains on the *in situ* biodegradation of endosulfan and the reduction of endosulfan-contaminated soil toxicity, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, pp.: 75-83.
- Kumar, N., Sharma, R., Tripathi, G., Kumar, K., Dalvi, R. S., y Krishna, G. (2016) Cellular Metabolic, Stress, and Histological Response on Exposure to Acute Toxicity of Endosulfan in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*), *Environmental Toxicology*, 31 (1), pp.: 106-115.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Sanchez, L. C., Bassó, A. (2010) Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (7), pp.: 1517-1524.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bassó, A., y Lorenzatti, E. (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-

- ammonium, *Mutation Research*, 769, pp.: 7-12.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Colussi, C. L., y Martinuzzi, C. S. (2018) Blood biomarkers of common toad *Rhinella arenarum* following chlorpyrifos dermal exposure, *Interdisciplinary Toxicology*, 11 (2), pp.: 148-154.
- Lambert, M. R. K. (2005) Lizards used as bioindicators to monitor pesticide contamination in sub-Saharan Africa: A review, *Applied Herpetology*, (1984), pp.: 99-107.
- Landry, D., Dousset, S., Fournier, J. C., y Andreux, F. (2005) Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards (Vosne-Romaneé, 21-France), *Environmental Pollution*, 138 (2), pp.: 191-200.
- Lanfranchi, A. L., Menone, M. L., Miglioranza, K. S. B., Janiot, L. J., Aizpún, J. E., y Moreno, V. J. (2006) Striped weakfish (*Cynoscion guatucupa*): A biomonitor of organochlorine pesticides in estuarine and near-coastal zones, *Marine Pollution Bulletin*, 52 (1), pp.: 74-80.
- de Lange, H. J., Lahr, J., Van Der Pol, J. J. C., Wessels, Y., y Faber, J. H. (2009) Ecological vulnerability in wildlife: An expert judgment and multicriteria analysis tool using ecological traits to assess relative impact of pollutants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (10), pp.: 2233-2240.
- Lanzarin, G. A. B., Félix, L. M., Santos, D., Venâncio, C. A. S., y Monteiro, S. M. (2019) Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation – Roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis, *Chemosphere*. Pergamon, 223, pp.: 514-522.
- de Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S. A., Borràs, M., Martins, M. G., Costa, P. M., y Pacheco, M. (2015) The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives., *Frontiers in genetics*, 6(June), pp.: 180.
- Larramendy, M., Nikoloff, N., De Arcaute, C., y Soloneski, S. (2014) Genotoxicity and Cytotoxicity Exerted by Pesticides in Different Biotic Matrices: An Overview of More Than a Decade of Experimental Evaluation, *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 4(4), pp.: 3-30.
- Larramendy, M. L., Molinari, G., González, N. V., Pilili, P., Vera-Candioti, J. V., Reigosa, M. A., y Soloneski, S. (2010) Agroquímicos en Argentina . Genotoxicidad y citotoxicidad inducida por principios activos y sus formulaciones comerciales, *Journal of Basic and Applied Genetic*, 21(2), pp.: 1-6.
- Larriera, A. y Imhof, A. (2006) Proyecto Yacaré. Cosecha de huevos para crías en granjas del género Caiman en la Argentina, en: Bolkovic, M. L. y D. Ramadori (ed.) *Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable*. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, pp.: 51-64.
- Latorre, M. A., López González, E. C., Larriera, A., Poletta, G. L., y Siroski, P. A. (2013) Effects of in vivo exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*, *Journal of Immunotoxicology*, 10(4), pp.: 349-354.
- Latorre, M. A., López González, E. C., Siroski, P. A., y Poletta, G. L. (2014) Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the Side-necked Turtle, *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835), *Acta Herpetologica*, 10(1), pp.: 31-37. doi: 10.13128/ACTA_HERPETOL-14988.
- Lee, R. F., Bulski, K., Adams, J. D., Peden-Adams, M., Bossart, G. D., King, L., y Fair, P. A. (2013) DNA strand breaks (comet assay) in blood lymphocytes from wild bottlenose dolphins, *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2), pp.: 355-360.
- Lee, R. F. y Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutation Research*, 544(1), pp.: 43-64.
- Leja-Szpak, A., Jaworek, J., Tomaszewska, R., Nawrot, K., Bonior, J., Kot, M., Palonek, M., Stachura, J.,

- Czupryna, A., Konturek, S. J., y Pawlik, W. W. (2004) Melatonin precursor, L-tryptophan protects the pancreas from development of acute pancreatitis through the central site of action, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(1 II), pp.: 239-254.
- Ley de fitosanitarios N° 11.273 (1995) *Ley Provincial de productos fitosanitarios N° 11.273, Provincia de Santa Fe*. Disponible en: https://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/3686/21012/file/LEY_11273.pdf.
- Liao, W., McNutt, M. A., y Zhu, W. G. (2009) The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods*, 48(1), pp.: 46-53.
- Lindahl, T. y Barnes, D. E. (2000) Repair of endogenous DNA damage, en *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp.: 127-133.
- Liu, W., Zhu, L.-S., Wang, J., Wang, J.-H., Xie, H., y Song, Y. (2009) Assessment of the Genotoxicity of Endosulfan in Earthworm and White Clover Plants Using the Comet Assay, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer-Verlag, 56(4), pp.: 742-746.
- López González, E. C., Latorre, M. A., Larriera, A., Siroski, P. A., y Poletta, G. L. (2013) Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed *in vivo* to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), pp.: 131-134.
- López González, E. C., Larriera, A., Siroski, P. A., y Poletta, G. L. (2017) Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, pp.: 84-91.
- López González, E. C., Siroski, P. A., y Poletta, G. L. (2019) Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman), *Chemosphere*, 232, pp.: 337-344.
- López, S. L., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R. C., Mañas, F., Poletta, G. L., Sánchez, N., Simoniello, M. F., y Carrasco, A. E. (2012) Pesticides Used in South American GMO-Based Agriculture: A review of their effects on humans and animal models, en: Fishbein, J. C. (ed.) *Advances in Molecular Toxicology*. Cap. 2, Elsevier, Vol. 6, pp.: 41-75.
- Lord, C. J. y Ashworth, A. (2012) The DNA damage response and cancer therapy, *Nature*, 481(7381), pp.: 287-294. doi: 10.1038/nature10760.
- Lorenzatti, E. A., Negro, C. L., de la Sierra, P., Marino, F., y Lenardón, A. (2008) Plaguicidas en aire. Estudio preliminar en la ciudad de Santa Fe, *Revista FABICIB*, 12, pp.: 129-135.
- Lozano, V. L., Vinocur, A., Sabio y García, C. A., Allende, L., Cristos, D. S., Rojas, D., Wolansky, M., y Pizarro, H. (2018) Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: A microcosms approach, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, pp.: 1010-1019.
- Luaces, J. P., Rossi, L. F., Chirino, M. G., Browne, M., Merani, M. S., y Mudry, M. D. (2017) Genotoxic effects of Roundup Full II® on lymphocytes of *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): *In vitro* studies, *PLoS ONE*, 12(8), pp.: 1-9.
- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., y Storey, K. B. (2018) Pesticide toxicity: A mechanistic approach, *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 17, pp.: 1101-1136.
- Luzhna, L., Kathiria, P., y Kovalchuk, O. (2013) Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond, *Frontiers in Genetics*, 4(JUL), pp.: 1-17.

- Lynch, A. M., Eastmond, D., Elhajouji, A., Froetschl, R., Kirsch-Volders, M., Marchetti, F., Masumura, K., Pacchierotti, F., Schuler, M., y Tweats, D. (2019) Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneuploids for carcinogenesis and hereditary diseases, *Mutation Research*, 847, pp.: 403025.
- Maceda-Veiga, A., Figuerola, J., Martínez-Silvestre, A., Viscor, G., Ferrari, N., y Pacheco, M. (2015) Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment, *Science of the Total Environment*, 514, pp.: 322-332.
- Macedo, J. C., Vaz, S., Bakker, B., Ribeiro, R., Bakker, P. L., Escandell, J. M., Ferreira, M. G., Medema, R., Foijer, F., y Logarinho, E. (2018) FoxM1 repression during human aging leads to mitotic decline and aneuploidy-driven full senescence, *Nature Communications*, 9(1), p.: 2834.
- MAGyP (2019a) *Estimaciones Agrícolas, Subsecretaría de Agricultura, Dirección Nacional de Estimaciones, Delegaciones y Estudios Económicos*. Disponible en: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/_archivos/estimaciones/190000_2019/190200_Febrero/190228_Informe_Semanal_28_02_19.pdf (Accedido: 8 de marzo de 2019).
- Mai, H., Cachot, J., Clérandeau, C., Martin, C., Mazzela, N., Gonzalez, P., y Morin, B. (2018) An environmentally realistic pesticide and copper mixture impacts embryonic development and DNA integrity of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Environmental Science and Pollution Research*, pp.: 1-12.
- Mañas, F., Peralta, L., Gorla, N., Bosh, B., y Aiassa, D. (2009) Aberraciones cromosómicas en trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas, *BAG. Journal of basic and applied genetics*. Sociedad Argentina de Genética, 20(1), pp.: 9-13.
- Mañas, F. (2012) ¿Qué sabemos sobre los efectos biológicos del plaguicida más empleado en nuestro país? El herbicida glifosato bajo la lupa, en: Aiassa, D., Bosch, B., y Mañas Torres, F. (eds.) *Plaguicidas a la carta: daño genético y otros riesgos*. 1ª ed. Córdoba, Argentina: Miguel Ángel Tréspidi Ediciones, pp.: 80-105.
- Manes, M. E., Ibañez, M. A., y Manlla, A. (2003) Factores físicos y conductas de nidificación de lagartos *Tupinambis merianae* en cautiverio., *Revista Argentina de Producción Animal*, 23, pp.: 119-126.
- Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B., y Wilson, S. P. (2009) Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment, *Environmental Pollution*, 157(11), pp.: 2903-2927. doi: 10.1016/j.envpol.2009.05.015.
- Mansour, S. A. (2008) Environmental Impact of Pesticides in Egypt, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 196, pp.: 1-51.
- Manzanilla, J. y Péfaur, J. E. (2000) Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles, *Revista Ecológica Latinoamericana*, 7(3), pp.: 17-30.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., y Bellé, R. (2002) Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation, *Chemical Research in Toxicology*, 15(3), pp.: 326-3.
- Marc, J., Bellé, R., Morales, J., Cormier, P., y Mulner-Lorillon, O. (2004) Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition, *Toxicological Sciences*, 82(2), pp.: 436-442.
- Marco, A., Hidalgo-Vila, J., y Díaz-Paniagua, C. (2004) Toxic effects of ammonium nitrate fertilizer on flexible-shelled lizard eggs, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 73(1), pp.: 125-131.

- Marcozzi, A., Pellestor, F., y Kloosterman, W. P. (2018). The genomic characteristics and origin of chromothripsism, en: Franck Pellestor (ed.), *Chromothripsis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1769. Humana Press, New York, NY, pp.: 3-19.
- Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., y Pacheco, M. (2014) Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods - insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 166, pp.: 126-133.
- Marques, T. S., Bassetti Bochetti, Luis Antonio Lara Freitas, N. R., Millan, C. H., Piña, C. I., y Verdade, L. M. (2016) Population structure of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) in natural and man-made water bodies associated with a silvicultural landscape, *Salamandra*, 1(52), pp.: 1-10.
- Martin-Culma, N. Y. y Arenas-Suárez, N. E. (2018) Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola, *Entramado*, 14 (1), pp.: 232-240.
- Martin, M. L. (2011) *Impacto del uso de plaguicidas asociados al cultivo de soja transgénica sobre especies no blanco de la flora riparia y acuática*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Martínez-López, E., Espín, S., Barbar, F., Lambertucci, S. A., Gómez-Ramírez, P., y García-Fernández, A. J. (2015) Contaminants in the southern tip of South America: Analysis of organochlorine compounds in feathers of avian scavengers from Argentinean Patagonia, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115, pp.: 83-92.
- Martínez-Silvestre, A., Lavín, S., y Cuenca, R. (2011) Hematology and blood cytology in reptiles, *Clinica Veterina de Pequeños Animales*, 31(3), pp.: 131-141.
- Martínez-Valenzuela, C., Waliszewski, S. M., Amador-Muñoz, O., Meza, E., Calderón-Segura, M. E., Zenteno, E., Huichapan-Martínez, J., Caba, M., Félix-Gastélum, R., y Longoria-Espinoza, R. (2017) Aerial pesticide application causes DNA damage in pilots from Sinaloa, Mexico, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), pp.: 2412-2420.
- Martins, M. y Costa, P. M. (2015) The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms, *Mutagenesis*, 30(1), pp.: 89-106.
- Martos Mula, A. F. (2005) Diferencias en la ejecución cognitiva y actividades colinesterasa en adolescentes con exposición ambiental a plaguicidas en Jujuy (Argentina), *Revista de Toxicología*, 22, 180-184
- Matson, C. W., Bickham, J. W., Palatnikov, G., Islamzadeh, A., McDonald, T. J., y Autenrieth, R. L. (2005) Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan, *Ecotoxicology*, 14(5), pp.: 513-525.
- McDiarmi, R. W., Foster, M. S., Guyer, C., Gibbons, J. W., y Chernoff, N. (2012) *Reptile biodiversity standard methods for inventory and monitoring*. University of California Press, Berkeley.
- Medina, M. H., Correa, J. A., y Barata, C. (2007) Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress, *Chemosphere*, 67(11), pp.: 2105-2114.
- Menezes, R. G., Qadir, T. F., Moin, A., Fatima, H., Hussain, S. A., Madadin, M., Pasha, S. B., Al Rubaish, F. A., y Senthilkumaran, S. (2017) Endosulfan poisoning: An overview, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 51, pp.: 27-33.
- Mercille, S. y Massie, B. (1994) Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells, *Biotechnol Bioeng*, 44(9), pp.: 1140-1154.

- Mestre, A. P., Amavet, P. S., Vanzetti, A. I., Moleón, M. S., Parachú Marcó, M. V., Poletta, G. L., y Siroski, P. A. (2019) Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, pp.: 61-67.
- Meza-Joya, F. L., Ramírez-Pinilla, M. P., y Fuentes-Lorenzo, J. L. (2013) Toxic, cytotoxic, and genotoxic effects of a glyphosate formulation (Roundup® SL- Cosmoflux® 411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54(5), pp.: 362-373.
- Miglioranza, K. S. B., Gonzalez, M., Ondarza, P. M., Shimabukuro, V. M., Isla, F. I., Fillmann, G., Aizpún, J. E., y Moreno, V. J. (2013) Assessment of Argentinean Patagonia pollution: PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río Negro basin, *Science of The Total Environment*, 452-453, pp.: 275-285.
- Migliore, L., Di Bucchianico, S., y Uboldi, C. (2014) The *In Vitro* Micronucleus Assay and FISH Analysis, en L. Maria Sierra y Isabel Gaivao (eds.) *Genotoxicity and DNA Repair: A practical approach*. Springer New York, pp.: 73-102.
- Milnes, M. R. y Guillette, L. J. (2008) Alligator Tales: New Lessons about Environmental Contaminants from a Sentinel Species, *BioScience*, 58(11), pp.: 1027-1036.
- Mingo, V. (2018) The use of plant protection products and its impact on reptiles. Tesis Doctoral, Universität Trier zur. Disponible en: <https://ubt.opus.hbz-nrw.de/opus45-ubtr/frontdoor/deliver/index/docId/960>
- Mingo, V., Lötters, S., y Wagner, N. (2017) The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles—A field study, *Science of The Total Environment*, 590, pp.: 114-124.
- Mitchelmore, C., Rowe, C., y Place, A. (2005) Tools for Assessing Contaminant Exposure and Effects in Reptiles, en: Gardner, S. C. y Oberdörster, E. (eds.) *Toxicology of reptiles*. CRC/Taylor & Francis, pp.: 63-122.
- Mo, C. H., Cai, Q. Y., Li, H. Q., Zeng, Q. Y., Tang, S. R., y Zhao, Y. C. (2008) Potential of different species for use in removal of DDT from the contaminated soils, *Chemosphere*, 73(1), pp.: 120-125.
- Mobarak, Y. M. y Al-Asmari, M. A. (2011) Endosulfan Impacts on the Developing Chick Embryos: Morphological, Morphometric and Skeletal Changes, *International Journal of Zoological Research*, 7(2), pp.: 107-127.
- Modesto, K. a y Martinez, C. B. R. (2010) Effects of Roundup Transorb® on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity, *Chemosphere*, 81(6), pp.: 781-787.
- Mohamad, H. R. y Kadry, M. A. (2014) Study of Chromosomal and DNA Damage Baseline Level in Two Subspecies of *Chamaeleo chamaeleon* in Egypt Using Micronucleus and Comet Assays, *International Journal of Science and Research*, 3(6), pp.: 2642-2644.
- Møller, P. (2019) Effect of age and sex on the level of DNA strand breaks and oxidatively damaged DNA in human blood cells, *Mutation Research*, pp.: 16-21.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B., y Torres, R. (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*, 12(1), pp.: 75-92.
- Montgomery, D. 2004. Diseño y análisis de experimentos. 2da Edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México.
- Moon, Y.-S., Jeon, H.-J., Nam, T.-H., Choi, S.-D., Park, B.-J., Ok, Y. S., y Lee, S.-E. (2016) Acute toxicity and gene responses induced by endosulfan in zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Chemical Speciation*

- & *Bioavailability*, 28(1-4), pp.: 103-109.
- Moreno Cestari, N., Sofia, S. H., y Martinez, C. B. R. (2014) Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, pp.: 448-454.
- Morley, A. A. (1995) The somatic mutation theory of ageing, *Mutation Research*, 338(1), pp.: 19-23.
- Motta, E. V. S., Raymann, K., y Moran, N. A. (2018) Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 115(41), pp.: 10305-10310.
- Mouneyrac, C. y Amiard-Triquet, C. (2013) Biomarkers of Ecological Relevance in Ecotoxicology, en: Féraud, J. F. y Blaise, C. (eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Dordrecht: Springer, pp.: 221-236.
- Mrema, E., Rubino, F. M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A. M., y Colosio, C. (2013) Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity, *Toxicology*, 307, pp.: 74-88.
- Mudhoo, A., Bhatnagar, A., Rantalankila, M., Srivastava, V., y Sillanpää, M. (2018) Endosulfan removal through bioremediation, photocatalytic degradation, adsorption and membrane separation processes: A review, *Chemical Engineering Journal*, 360, pp.: 912-928.
- Mudry, M. D. y Abrevaya, X. (2006) Evaluación de Aneugenicidad y Clastogenicidad, en: Mudry, Marta D. y Carballo, M. A. (eds.) *Genética Toxicológica*. 1ra ed. Buenos Aires, Argentina: De los Cuatro Vientos Editorial, pp.: 277-298.
- Mudry, M. D. y Carballo, M. A. (2006) Principios de Genética Toxicológica, en: Mudry, M. D. y Carballo, M. A. (eds.) *Genética Toxicológica*. 1ra ed. Buenos Aires, Argentina: De los Cuatro Vientos Editorial, pp.: 57-82.
- Mumuni, A. A. y Sogbanmu, T. O. (2018) Embryotoxic, developmental and genotoxic evaluations of an endosulfan and deltamethrin mixture on the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*), *West African Journal of Applied Ecology*, 26(1), pp.: 1-10.
- Murussi, C. R., Costa, M. D., Leitemperger, J. W., Guerra, L., Rodrigues, C. C. R., Menezes, C. C., Severo, E. S., Flores-Lopes, F., Salbego, J., y Loro, V. L. (2016) Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*, *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), pp.: 445-455.
- Nath, A., Vendan, S. E., Priyanka, K., Singh, C. K., y Kumar, S. (2013) Carcinogenic pesticides residue detection in cow milk and water samples from Patna, India, *Current Trends in Biotechnology and Chemical Research January-June*, 3(1), pp.: 1-7.
- Neuparth, T., Bickham, J. W., Theodorakis, C. W., Costa, F. O., y Costa, M. H. (2006) Endosulfan-induced genotoxicity detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by means of flow cytometry and micronuclei assays, *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 76(2), pp.: 242-248.
- Newbold, R., Padillabanks, E., Snyder, R., Phillips, T., y Jefferson, W. (2007) Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic, *Reproductive Toxicology*, 23(3), pp.: 290-296.
- Noriega, T., Ibañez, M. A., Bru, E., y Manes, M. E. (2002) The testicular cycle of captive *Tupinambis meriana* lizards in a temperate environment, *Cuadernos de Herpetología*, pp.: 119-127.
- Novillo, A., Kitana, N., Marquez, E., y Callard, I. P. (2006) Reptilian genotoxicity, en *Toxicology of reptiles*. Gardner, S. CRC Press/Taylor & Francis, pp.: 241.

- NRC (1991) *Environmental Epidemiology: Public Health and Hazardous Wastes*. Washington.
- O'Rourke, D. P. y Lertpiriyapong, K. (2015) Chapter 19 - Biology and Diseases of Reptiles, en *Laboratory Animal Medicine: Third Edition*. Academic Press, pp.: 967-1013.
- Ockleford, C. *et al.* (2018) Scientific Opinion on the state of the science on pesticide risk assessment for amphibians and reptiles, *EFSA Journal*, 16(2).
- OECD (2001a) Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study, en *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. OECD Publishing, pp.: 11.
- OECD (2001b) Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity, en *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. OECD Publishing (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4), pp.: 1-29.
- OECD (2010) *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. Paris. doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264091016-en>.
- OECD (2014a) *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. Paris. doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224292-en>.
- OECD (2014b) *Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test*. Paris. doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224407-en>.
- OECD (2014c) *Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*. Paris. doi: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264224179-en>.
- OECD (2017) *Guidelines for the Testing of Chemicals - OECD*. Disponible en: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm> (Accedido: 31 de enero de 2017).
- OECD (2019) *Test No. 203: Fish Acute Toxicity Test*. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069961-en.pdf?expires=1586313469&id=id&accname=guest&checksum=5D520635E71DC5F4DA6E504B435D99FA>
- OECD (1984) *Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-207-earthworm-acute-toxicity-tests_9789264070042-en
- OECD (2013) *Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-210-fish-early-life-stage-toxicity-test_9789264203785-en
- OECD (1998) *Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-212-fish-short-term-toxicity-test-on-embryo-and-sac-fry-stages_9789264070141-en
- OECD (2016) *Test No. 223: Avian Acute Oral Toxicity Test*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-223-avian-acute-oral-toxicity-test_9789264264519-en
- OECD (2013) *Test No. 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-237-honey-bee-apis-mellifera-larval-toxicity-test-single-exposure_9789264203723-en
- Ohe, T., Watanabe, T., y Wakabayashi, K. (2004) Mutagens in surface waters: A review, *Mutation Research*, 567, pp.: 109-149.
- Olive, P. L., Banáth, J. P., y Durand, R. E. (1990) Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the Comet Assay, *Radiation Research*, 122(1), pp.: 86-94.

- Oliveira, M., Ahmad, I., Maria, V. L., Ferreira, C. S. S., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M., y Santos, M. A. (2010) Evaluation of oxidative DNA lesions in plasma and nuclear abnormalities in erythrocytes of wild fish (*Liza aurata*) as an integrated approach to genotoxicity assessment, *Mutation Research*, 703(2), pp.: 83-89.
- Olmos, F. (1995) *Tupinambis teguixin* (tegu lizard). Aquatic behavior, *Herpetological Review*, 26, p.: 37.
- Olson, G. A., Hessler, J. R., y Faith, R. E. (1977) Technics for blood collection and intravascular infusion of reptiles, *Laboratory Animal Science*, 25(6), pp.: 783-786.
- OMS (2014) *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. 2009*. World Health Organization.
- Ortega García, J. A., Ferrís Tortajada, J., Cánovas Conesa, A., y Garcia Castell, J. (2005) Environmental toxins. Metals: Adverse effects on the fetal and postnatal nervous systems, *Acta Pediatrica Española*, 63(21), pp.: 182-192.
- Ortiz Hernández, M. L., Sánchez Salinas, E., Folch Mallol, J. L., Olvera Velona, A., Danta González, E., Valencia Quintana, R., Gómez Arroyo, S., Castillo Cadena, J., y Sánchez Alrcón, J. (2014) Genotoxicidad de plaguicidas: Bioensayos a corto plazo, en *Los plaguicidas en México. Aspectos generales, toxicológicos y ambientales.*, pp.: 73-96.
- Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 123(1), pp.: 291-298.
- Pacheco, M., Santos, M. A., Teles, M., Oliveira, M., Rebelo, J. E., y Pombo, L. (2005) Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*Liza sp.*) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal), *Environmental Monitoring and Assessment*, 107(1-3), pp.: 133-153.
- Packard, G. C. y Packard, M. J. (1988) The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, en Gans, C. (ed.) *Biology of the Reptilia*. New York, USA: Alan R Liss Inc., pp.: 523-605.
- Páez, V. P., Correa, J. C., Cano, A. M., y Bock, B. C. (2009) A Comparison of Maternal and Temperature Effects on Sex, Size, and Growth of Hatchlings of the Magdalena River Turtle (*Podocnemis lewyana*) Incubated under Field and Controlled Laboratory Conditions, *Copeia*, 2009(4), pp.: 698-704.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., y Carrasco, A. E. (2010) Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling, *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), pp.: 1586-1595.
- Palmer, B. D. (2000) Aspects of reptilian anatomy and physiology, en: Sparling, D. W. *et al.* (eds.) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. 2nd ed. Pensacola, FL, USA: SETAC, pp.: 111-139.
- Palmquist, K., Salatas, J., y Fairbrother, A. (2012) Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology, en: Perveen, F. (ed.) *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. InTech Europe, pp.: 251-278.
- Pandey, C., Prabha, D., y Negi, Y. K. (2018) Mycoremediation of Common Agricultural Pesticides, en: Prasad, R. (ed.) *Mycoremediation and Environmental Sustainability*. Springer, Cham, pp.: 155-179.
- Pandey, N., Gundevia, F., Prem, A. S., y Ray, P. K. (1990) Studies on the genotoxicity of endosulfan, an organochlorine insecticide, in mammalian germ cells, *Mutation Research*, 242(1), pp.: 1-7.
- Pandey, S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Sharma, S., Srivastava, S. K., y Verma, M. S. (2006) Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by

- alkaline single-cell gel electrophoresis, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(1), pp.: 56-61.
- Pant, K., Springer, S., Bruce, S., Lawlor, T., Hewitt, N., y Aardema, M. J. (2014) Vehicle and positive control values from the *in vivo* rodent comet assay and biomonitoring studies using human lymphocytes: Historical database and influence of technical aspects, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(8), pp.: 633-642.
- Papa, J. C. y Massaro, R. (2005) Herbicida metsulfuron metil en barbechos químicos., pp.: 2004-2006.
- Park, B., Lim, S., Park, J., Oh, Y., Joo, H., Lee, M., Yoon, H., Choi, G., y Ryu, S. (2018) Residues of Organochlorine Pesticides in Grape (*Vitis vinifera*) and Peach (*Prunus persica*) Orchard Soil and Fruit, 한국농약학회 학술발표대회 논문집, pp.: 144-144.
- Paskova, L., Smesny Trtkova, K., Fialova, B., Benedikova, A., Langova, K., y Kolar, Z. (2013) Different effect of sodium butyrate on cancer and normal prostate cells, *Toxicology in Vitro*, 27(5), pp.: 1489-1495.
- Pašková, V., Hilscherová, K., y Bláha, L. (2011) Teratogenicity and Embryotoxicity in Aquatic Organisms After Pesticide Exposure and the Role of Oxidative Stress, en: Whitacre, D. M. (ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 211. Springer, New York, NY, pp.: 25-61.
- Pauli, B. D., Money, S., y Sparling, D. W. (2010) Ecotoxicology of pesticides in reptiles, en: Sparling, D. W. et al. (eds.) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. 2nd edn. Pensacola, FL, USA: SETAC, pp.: 203-224.
- Paulino, M. G., Souza, N. E. S., y Fernandes, M. N. (2012) Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, pp.: 6-13.
- Peixoto, F. (2005) Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation, *Chemosphere*, 61(8), pp.: 1115-1122.
- Peluso, J., Aronzon, C. M., y Pérez Coll, C. S. (2019) Assessment of environmental quality of water bodies next to agricultural areas of Buenos Aires province (Argentina) by means of ecotoxicological studies with *Rhinella arenarum*, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, pp.: 1-10.
- Pengue, W. A. (2001) Expansión de la soja en Argentina Globalización, Desarrollo Agropecuario e Ingeniería Genética: Un modelo para armar, *Revista Biodiversidad*, 29, pp.: 1-27.
- Pengue, W. A. (2004) Producción e (in) seguridad alimentaria: El caso de la soja en Argentina, *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*, 1, pp.: 45-27.
- Peralta, L., Mañas, F., Gentile, N., Bosch, B., Méndez, A., y Aiassa, D. (2011) Evaluación del daño genético en pobladores de Marcos Juárez expuestos a plaguicidas, estudio de un caso en Córdoba, Argentina, *Revista diáLogos*, 2(1), pp.: 7-26.
- Pérez-Landeiro, A., Allende-Bandrés, M. A., Fernández, M. J. A., y Palomo, P. P. (2002) Teratogénesis: clasificaciones, *Farmacia Hospitalaria*, 26(3), pp.: 171-177.
- Pérez, D. J., Lukaszewicz, G., Menone, M. L., y Camadro, E. L. (2011) Sensitivity of *Bidens laevis* L. to mutagenic compounds. Use of chromosomal aberrations as biomarkers of genotoxicity, *Environmental Pollution*, 159(1), pp.: 281-286.
- Pérez, D. J., Lukaszewicz, G., Menone, M. L., V. Amé, M., y Camadro, E. L. (2014) Genetic and biochemical biomarkers in the macrophyte *Bidens laevis* L. Exposed to a commercial

- formulation of endosulfan, *Environmental Toxicology*, 29(9), pp.: 1063-1071.
- Pérez, G. L., Torremorell, A., Mugni, H., Rodríguez, P., Solange Vera, M., Do Nascimento, M., Allende, L., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M., Izaguirre, I., Pizarro, H., Bonetto, C., Morris, D. P., y Zagarese, H. (2007) Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: A mesocosm study, *Ecological Applications*, 17(8), pp.: 2310-22.
- Perussolo, M. C., Guiloski, I. C., Lirola, J. R., Fockink, D. H., Corso, C. R., Bozza, D. C., Prodocimo, V., Mela, M., Ramos, L. P., Cestari, M. M., Acco, A., y Silva de Assis, H. C. (2019) Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, p.: 109438.
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., y Ronco, A. E. (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina, *Environmental Pollution*, 156(1), pp.: 61-66.
- Peters, P. W. J. y Piersma, A. H. (1990) *In vitro* embryotoxicity and teratogenicity studies, *Toxicology in Vitro*, 4(4-5), pp.: 570-576.
- Pianka, E. R. y Vitt, L. J. (2003) *Lizards: Windows to the Evolution of Diversity (Vol. 5)*. University of California Press.
- Piña, C. y Larriera, A. (2002) *Caiman latirostris* growth: the effect of a management technique on the supplied temperature, *Aquaculture*, 211(1), pp.: 387-392.
- Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sánchez-Pérez, J. M., y Pinelli, E. (2011) Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France, *Aquatic Toxicology*, 101(1), pp.: 126-134.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., y Mudry, M. D. (2008) *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay, *Mutation Research*, 650 (2), pp.: 202-209.
- Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., y Mudry, M. D. (2009) Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test, *Mutation Research*, 672 (2), pp.: 95-102.
- Poletta, G. L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M. D., Larriera, A., y Siroski, P. A. (2011) Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 (4), pp.: 852-859.
- Poletta, G. L. (2011) Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en *Caiman latirostris* (Yacaré overo) como organismo centinela de los humedales de Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Poletta, G. L., Simoniello, M. F., Porcel de Peralta, M., Kleinsorge, E., Siroski, P., y Mudry, M. D. (2012) Evaluation of pesticide-induced DNA damage and oxidative stress on human and wildlife populations in Santa Fe province (Argentina), en: Abrego Gomez, A. J. y Lugo de Ortega, E. M. (eds.) *Pesticides: Characteristics, Uses and Health Implications*. New York, USA: Nova Science Publishers, pp.: 1-23.
- Poletta, G. L., López González, E., Burella, P. M., Romito, M. L., Siroski, P. A., y Mudry, M. D. (2017) Biomarkers of Environmental Contamination in Reptile Species: The Effect of Pesticide Formulations on Broad-snouted caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae), en Larramendy, M. L. (ed.) *Issues in Toxicology No. 33, Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp.: 467-517.

- Poletta, G. L., López González, E., Romito, M. L., Ávila, O. B., Contini, L. E. Análisis del efecto de plaguicidas sobre una especie de reptil autóctono de Argentina, el yacaré overo". VI Encuentro Iberoamericano de Biometría. Sangolquí, Ecuador, Noviembre de 2017.
- Poletta, G. L. y Siroski, P. A. (2019) Micronucleus experiments in Reptiles, en: Knasmüller, S. y Fenech, M. (eds.) *Issues in Toxicology No. 39, "The Micronucleus Assay in Toxicology"*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, pp.: 243-258.
- Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., y Martino, A. L. (2015) Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(9), pp.: 187-581.
- Pollo, F. E., Grenat, P. R., Otero, M. A., Babini, S., Salas, N. E., y Martino, A. L. (2019) Evaluation *in situ* of genotoxic and cytotoxic response in the diploid/polyploid complex *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae) inhabiting agroecosystems, *Chemosphere*, 216, pp.: 306-312.
- Porini, G. M. (2006) Proyecto Tupinambis: Una propuesta para el manejo de *Tupinambis rufescens* y *Tupinambis merianae* en la Argentina, en: Bolkovic, M. L. y Ramadori, D. (eds.) *Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programa de Uso Sustentable*. Dirección de Fauna Silvestre de Ambientes y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires., pp.: 65-75.
- Preston, R. J. y Hoffmann, G. R. (2008) Genetic Toxicology, en: Klaassen, C. D. (ed.) *Casarett & Doull's. Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 7th ed. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, pp.: 381-413.
- Primost, J. E., Marino, D. J. G., Aparicio, V. C., Costa, J. L., y Carriquiriborde, P. (2017) Glyphosate and AMPA, «pseudo-persistent» pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina, *Environmental Pollution*, 229, pp.: 771-779.
- Pushpanjali, A. K., Pal, A. K., Prasad, R. L., Prasad, A., Singh, S. K., Kumar, A., y Jadhao, S. B. (2005) *In ovo* embryotoxicity of α -endosulfan adversely influences liver and brain metabolism and the immune system in chickens, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82 (2), pp.: 103-114.
- Qu, C. S., Chen, W., Bi, J., Huang, L., y Li, F. Y. (2011) Ecological risk assessment of pesticide residues in Taihu Lake wetland, China, *Ecological Modelling*, 222 (2), pp.: 287-292.
- Quarcoo, F., Bonsi, C., y Tackie, N. (2014) Pesticides, the Environment, and Human Health, en: Soloneski, S. (ed.) *Pesticides-Toxic Aspects*. InTech Europe, pp.: 81-103.
- Quero, A. A. M., Ferré, D. M., Zarco, A., Cuervo, P. F., y Gorla, N. B. M. (2016) Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (24), pp.: 25224-25231.
- Quero, A. Á. M., Zarco, A., Landa, F. B., y Gorla, N. B. M. (2019) Plasma cholinesterase activities in wild birds from undisturbed woodlands in the central Monte desert, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38 (8), p.: etc.4458.
- Quijano, R. F. (2000) Risk assessment in a third-world reality: An endosulfan case history, *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 6 (4), pp.: 312-317.
- Quintana, M. G. (1991) Estimaciones sobre morfometría y crecimiento de la Iguana Colorada *Tupinambis rufescens* (Sauria, Teiidae) en la Argentina, *Revista del Museo argentino de ciencias naturales "Bernardino Rivadavia"*.
- Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., y Piña, B. (2008) Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain),

- Environmental Pollution*, 155 (1), pp.: 81-87.
- RAE (2012) *Significado del término «plaga»*, *Diccionario de la lengua española*. Disponible en: <http://dle.rae.es/?id=TIW9QYM%7CTIWEbvP>.
- Ramírez, J. A. y Lacasaña, M. (2001) Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición, *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4 (2), pp.: 67-75.
- Ramsdorf, W. A., Vicari, T., De Almeida, M. I. M., Artoni, R. F., y Cestari, M. M. (2012) Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers, *Environmental Monitoring and Assessment*, 184 (10), pp.: 5841-5849.
- Rau, A. T. K., Coutinho, A., Avabratha, K. S., Rau, A. R., y Warriar, R. P. (2012) Pesticide (Endosulfan) levels in the bone marrow of children with hematological malignancies, *Indian Pediatrics*, 49 (2), pp.: 113-117.
- Rauschenberger, R. H., Wiebe, J. J., Buckland, J. E., Smith, J. T., Sepúlveda, M. S., y Gross, T. S. (2004a) Achieving environmentally relevant organochlorine pesticide concentrations in eggs through maternal exposure in Alligator mississippiensis, *Marine Environmental Research*, 58(2-5), pp.: 851-6.
- Rauschenberger, R. H., Sepúlveda, M. S., Wiebe, J. J., Szabo, N. J., y Gross, T. S. (2004b) Predicting maternal body burdens of organochlorine pesticides from eggs and evidence of maternal transfer in *Alligator mississippiensis*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (12), pp.: 2906-2915.
- Rauschenberger, R. H., Wiebe, J. J., Sepúlveda, M. S., Scarborough, J. E., y Gross, T. S. (2007) Parental exposure to pesticides and poor clutch viability in *American alligators*, *Environmental Science and Technology*, 41 (15), pp.: 5559-5563.
- Ray, D. E. y Forshaw, P. J. (2000) Pyrethroid insecticides: Poisoning syndromes, synergies, and therapy, *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 38 (2), pp.: 95-101.
- Relyea, R. A. (2018) The interactive effects of predator stress, predation, and the herbicide Roundup, *Ecosphere*, 9 (11), p.: e02476.
- Repetto Jiménez, M. y G. Repetto Kuhn (2009). Evaluación de la toxicidad y del riesgo. Toxicología experimental, en: Repetto Jiménez, M. y G. Repetto Kuhn (eds.) *Toxicología fundamental*. 4ta ed. Madrid, España: Diaz de Santos Editorial, pp.: 403.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., y Seralini, G. (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase, *Environmental Health Perspectives*, 113, pp.: 716-720.
- Ridano, M. E., Racca, A. C., Flores-Martín, J., Camolotto, S. A., de Potas, G. M., Genti-Raimondi, S., y Panzetta-Dutari, G. M. (2012) Chlorpyrifos modifies the expression of genes involved in human placental function, *Reproductive Toxicology*, 33 (3), pp.: 331-338.
- Rigonato, J., Mantovani, M. S., y Jordão, B. Q. (2005) Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity, *Genetics and Molecular Biology*, 28 (3), pp.: 464-468.
- Rimoldi, F., Schneider, M. I., y Ronco, A. E. (2012) Short and Long-Term Effects of Endosulfan, Cypermethrin, Spinosad, and Methoxyfenozide on Adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Journal of Economic Entomology*, 105 (6), pp.: 1982-1987.
- Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H., y Gamet-Payraastre, L. (2016) Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature, *Chemico-Biological Interactions*, 254,

pp.: 231-246.

- Roberts, E. M., English, P. B., Grether, J. K., Windham, G. C., Somberg, L., y Wolff, C. (2007) Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley, *Environmental Health Perspectives*, 115 (10), pp.: 1482-1489.
- Rocha, C. F. D. (2008) Body size, female reproduction and sexual dimorphism in the lizard *Ameiva ameiva* (Teiidae) in a restinga of southeastern Brazil, *Revista Brasileira de Zoologia*, 25 (2), pp.: 370-372.
- Rodríguez, C. A. (2013) La salud de los trabajadores: Entre la ciencia y la ética, *Salud Colectiva*, pp.: 133-137.
- Rodriguez, E. M. (2006) Biomarcadores en fauna acuática: Estudios de campo y laboratorio, en un contexto ecotoxicológico, en: Mudry, M.D., Carballo, M. A. (ed.) *Genética Toxicológica*. Buenos Aires, Argentina: Cuatro Vientos Editorial, pp.: 459-479.
- Rogers, J. M. y Kavlock, R. J. (2008) Developmental toxicology, en: Klaassen, C. D. (ed.) *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 7th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., pp.: 415.
- Röhe, F. y Pinassi Antunes, A. (2008) Barred Forest Falcon (*Micrastur ruficollis*) Predation on Relatively Large Prey, *The Wilson Journal of Ornithology*, 120 (1), pp.: 228-230.
- Rohr, J. R., Schotthoefer, A. M., Raffel, T. R., Carrick, H. J., Halstead, N., Hoverman, J. T., Johnson, C. M., Johnson, L. B., Lieske, C., Piwoni, M. D., Schoff, P. K. y Beasley, V. R. (2008). Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature*, 455 (7217), pp.: 1235-1239.
- Ronco, A. E., Marino, D. J. G., Abelando, M., Almada, P., y Apartin, C. D. (2016) Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments, *Environmental Monitoring and Assessment*, 188 (8), pp.: 458.
- Rossi, L. F., Luaces, J. P., Palermo, A. M., Merani, M. S., y Mudry, M. D. (2018) Cytogenetic damage in peripheral blood cultures of *Chaetophractus villosus* exposed *in vivo* to a glyphosate formulation (Roundup), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, pp.: 121-127.
- Roy, N. M., Carneiro, B., y Ochs, J. (2016) Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, pp.: 45-54.
- Russo, A. y Degrassi, F. (2018) Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising, *Mutation Research*, 836 (February), pp.: 36-40.
- Saha, S. y Kaviraj, A. (2008) Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80 (1), pp.: 49-52.
- Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., Patel, K., Kashyap, R., Kulkarni, P., Rajan, B., y Lakkad, B. (2003) Effect of endosulfan on male reproductive development, *Environmental Health Perspectives*, 111 (16), pp.: 1958-62.
- Sánchez-Bayo, F. (2011) Impacts of Agricultural Pesticides on Terrestrial Ecosystems, en: Sánchez-Bayo, F.; Van den Brink, P. J.; Mann, R. M. (ed.) *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. Bentham Science Publishers Ltd., pp.: 63-87.
- Sanchez-Bayo, F. y Hyne, R. V. (2011) Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions, *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7 (4), pp.: 577-586.
- Sang, S. y Petrovic, S. (1999) Endosulfan-A Review of its Toxicity and its Effects on the Endocrine

System, *World Wild Life Fund –Canada*.

- Sant'Anna, S. S., Grego, K. F., Lorigados, C. A. B., Fonseca-Pinto, A. C. B. C., Fernandes, W., Sá-Rocha, L. C., y Catão-Dias, J. L. (2013) Malformations in neotropical viperids: Qualitative and quantitative analysis, *Journal of Comparative Pathology*, 149 (4), pp.: 503-508.
- de Santo, F. B., Guerra, N., Vianna, M. S., Torres, J. P. M., Marchioro, C. A., y Niemeyer, J. C. (2019) Laboratory and field tests for risk assessment of metsulfuron-methyl-based herbicides for soil fauna, *Chemosphere*, 222, pp.: 645-655.
- Sargsyan, A., Simonyan, A., Hovhannisyan, G., Arakelyan, M., y Aroutiounian, R. (2019) Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskia* lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution, *Mutation Research*, 842, pp.: 117-124.
- Sawhney, A. K. y Johal, M. S. (2000) Erythrocyte alterations induced by malathion in *Channa punctatus* (Bloch), *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 64(3), pp.: 398-405.
- Schaaf, A. A. (2013) Uso de pesticidas y toxicidad: Relevamiento en la zona agrícola de San Vicente, Santa Fe, Argentina, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4 (2), pp.: 323-331.
- Schaumburg, L. G., Siroski, P. A., Poletta, G. L., y Mudry, M. D. (2016) Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130, pp.: 71-78.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutation Research*, 31 (1), pp.: 9-15.
- Schnars, J. L., Voss, M. a, y Stauffer, J. R. (2011) An egg injection technique to evaluate the effect of polychlorinated biphenyls on the hatching success of the snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (4), pp.: 915-919.
- Schrödl, W., Krüger, S., Konstantinova-Müller, T., Shehata, A. A., Rulff, R., y Krüger, M. (2014) Possible Effects of Glyphosate on *Mucorales* Abundance in the Rumen of Dairy Cows in Germany, *Current Microbiology*, 69 (6), pp.: 817-823.
- Schwanz, L., Warner, D. a, McGaugh, S., Di Terlizzi, R., y Bronikowski, A. (2011) State-dependent physiological maintenance in a long-lived ectotherm, the painted turtle (*Chrysemys picta*), *The Journal of Experimental Biology*, 214 (Pt 1), pp.: 88-97.
- Schwerte, T., Voigt, S., y Pelster, B. (2005) Epigenetic variations in early cardiovascular performance and hematopoiesis can be explained by maternal and clutch effects in developing zebrafish (*Danio rerio*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141 (2), pp.: 200-209.
- Scott, N., Pelegrin, N., Montero, R., Kacoliris, F., Fitzgerald, L., Carreira, S., Cacciali, P., Moravec, J., Cisneros-Heredia, D.F., Aparicio, J., y Avila-Pires, T. C. S. (2016) *Salvator merianae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T178340A61322552.
- SENASA (2009) *Lista de formulados registrados-Septiembre de 2009*.
- SENASA (2011) *Resolución 511/2011*.
- SENASA (2014) *Lista de formulados registrados-Diciembre de 2014*.
- Shaposhnikov, S., Frengen, E., y Collins, A. R. (2009) Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent *in situ* hybridization-a review, *Mutagenesis*, 24 (5), pp.: 383-389.
- Sharma, S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Pandey, S., Srivastava, S. K., Singh, P. J., y Mathur, P. K. (2007) Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus*

- using the comet assay, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53 (4), pp.: 617-623.
- Sharma, S., Sharma, R. K., y Kaushik, D. (2018) Cypermethrin induced morphological changes in developing embryo of *Gallus domesticus*, *The Pharma Innovation International Journal*, 7 (11), pp.: 496-499.
- Sheperd, T. H. (2002) Annual commentary on human teratogens, *Teratology*, 66 (6), pp.: 275-277. doi: 10.1002/tera.10111.
- Shepherd, G. L. y Somers, C. M. (2012) Adapting the buccal micronucleus cytome assay for use in wild birds: Age and sex affect background frequency in pigeons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53 (2), pp.: 136-144.
- Shi, X., Gu, A., Ji, G., Li, Y., Di, J., Jin, J., Hu, F., Long, Y., Xia, Y., Lu, C., Song, L., Wang, S., y Wang, X. (2011) Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish, *Chemosphere*, 85 (6), pp.: 1010-1016.
- Shine, R. (1985) The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis, *Biology of the Reptilia*, 15 (8), pp.: 605-694.
- Sibley, P. K. y Hanson, M. I. (2011) Ecological Impacts of Organic Chemicals on Freshwater Ecosystem, en: Sánchez-Bayo, F., Van den Brink, P. J., y R. M. Mann (eds.) *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. Bentham Science Publishers Ltd., pp.: 63-87.
- Silva, J. S., El-Deir, A. C. A., Moura, G. J. B., Alves, R. R. N., y Albuquerque, U. P. (2014) Traditional Ecological Knowledge About Dietary and Reproductive Characteristics of *Tupinambis merianae* and *Hoplias malabaricus* in Semiarid Northeastern Brazil, *Human Ecology*, 42 (6), pp.: 901-911.
- Silva, M. H. y Beauvais, S. L. (2010) Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 (1), pp.: 4-17.
- Silva, M. H. y Gammon, D. (2009) An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan, *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 86 (1), pp.: 1-28.
- da Silva Souza, T. y Fontanetti, C. S. (2006) Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of *Nile tilapia* exposed to waters affected by refinery effluent, *Mutation Research*, 605 (1-2), pp.: 87-93.
- Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Mastandrea, C., Grigolato, R. A., Paonessa, A. M., y Carballo, M. A. (2010) Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population, *Biomarkers*, 15 (1), pp.: 52-60.
- Singh, N. C., Dasgupta, T. P., Roberts, E. V., y Mansingh, A. (1991) Dynamics of pesticides in tropical conditions. 1. Kinetic studies of volatilization, hydrolysis, and photolysis of dieldrin and .alpha.- and .beta.-endosulfan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (3), pp.: 575-579.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175 (1), pp.: 184-191.
- Singh, Z. (2018) Comet assay as a sensitive technique in occupational health studies; A literature review, *Journal of Occupational Health and Epidemiology*, 7 (4), pp.: 240-245.
- Skarphedinsdottir, H., Hallgrímsson, G. T., Hansson, T., Hägerroth, -Å., Liewenborg, B., Tjärnlund, U., Åkerman, G., Baršienė, J., y Balk, L. (2010) Genotoxicity in herring gulls (*Larus argentatus*) in Sweden and Iceland, *Mutation Research*, 702, pp.: 24-31.
- Slaby, S., Marin, M., Marchand, G., y Lemiere, S. (2019) Exposures to chemical contaminants: What

- can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature?, *Environmental Pollution*, 248, pp.: 478-495.
- Smits, J. y Naidoo, V. (2018) Toxicology of Birds of Prey, en: Sarasola, J.; Grande, J.; Negro, J. (ed.) *Birds of Prey*. Cham: Springer International Publishing, pp.: 229-250.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., y Weiner, M. L. (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment, *Toxicology*, 171 (1), pp.: 3-59.
- Sogorb, M. A., Estévez, J., y Vilanova, E. (2014) Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics, en: Gupta, R. (ed.) *Biomarkers in Toxicology*. Boston, MA, USA: Academic Press, pp.: 965-973.
- Sogorb, M. A. y Vilanova, E. (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, *Toxicology Letters*, 128 (1), pp.: 215-228.
- Solis, M., Mugni, H., Fanelli, S., y Bonetto, C. (2017) Effect of agrochemicals on macroinvertebrate assemblages in Pampasic streams, Buenos Aires, Argentina, *Environmental Earth Sciences*, 76 (4), pp.: 180.
- de Solla, S. R. (2016) Exposure, bioaccumulation, metabolism and monitoring of persistent organic pollutants in terrestrial wildlife, en: Alae, M. (ed.) *Dioxin and Related Compounds. Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Cham, pp.: 203-252.
- de Solla, S. R. y Martin, P. A. (2011) Absorption of current use pesticides by snapping turtle (*Chelydra serpentina*) eggs in treated soil, *Chemosphere*, 85 (5), pp.: 820-825.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., y Larramendy, M. L. (2016) Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (17), pp.: 17811-17821.
- Souto, H. N., de Campos Júnior, E. O., Campos, C. F., Rodrigues, T. S., Pereira, B. B., y Morelli, S. (2018) Biomonitoring birds: The use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil, *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (24), pp.: 24084-24092.
- Souza Casadinho, J. (2009) La problemática del uso de plaguicidas en Argentina. *Modelos productivos e impacto en el ambiente*. Red de Acción de Plaguicidas y sus alternativas de América latina RAPAL. 15 (4), pp.: 2013. Disponible en: http://www.rap-al.org/articulos_files/Plaguicidas_Argentina.Pdf.
- de Souza, S. C. R., de Carvalho, J. E., Abe, A. S., Bicudo, J. E. P. W., y Bianconcini, M. S. C. (2004) Seasonal metabolic depression, substrate utilisation and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*), *Journal of Experimental Biology*, 207 (2), pp.: 307-318.
- Sparks, T. C., Pavloff, A. M., Rose, R. L., y Clower, D. F. (2015) Temperature-Toxicity Relationships of Pyrethroids on *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Anthonomus grandis grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), *Journal of Economic Entomology*, 76 (2), pp.: 243-246.
- Sparling, D. W., Matson, C., Bickham, J., y Doelling-Brown, P. (2006) Toxicity of glyphosate as Glypro® and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (10), pp.: 2768-2774.
- Spivak, G. (2015) New developments in comet-FISH, *Mutagenesis*, 30 (1), pp.: 5-9.

- Sreekumar, K. M. y Prathapan, K. D. (2013) A critique of the epidemiological studies on health in allegedly endosulfan-affected areas in Kasaragod, Kerala, *Current Science*, 104 (1), pp.: 16-21.
- Stanley, K. a, Curtis, L. R., Massey Simonich, S. L., y Tanguay, R. L. (2009) Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development, *Aquatic Toxicology*, 95 (4), pp.: 355-361.
- Stewart, K. R., Keller, J. M., Templeton, R., Kucklick, J. R., y Johnson, C. (2011) Monitoring persistent organic pollutants in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) confirms maternal transfer, *Marine Pollution Bulletin*, 62 (7), pp.: 1396-1409.
- Stice, S. A., Beedanagari, S. R., Vulimiri, S. V., Bhatia, S. P., y Mahadevan, B. (2019) Genotoxicity Biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility, en: Gupta, R. C. (ed.) *Biomarkers in Toxicology* (Second Edition). Academic Press, pp.: 807-821.
- Stončius, D. (2009) Spontaneous micronuclei in embryos of the Black-headed Gull (*Larus ridibundus* L.) populations, *Ekologija*, 1, pp.: 63-66.
- Stončius, D. y Lazutka, J. R. (2003) Spontaneous and benzo[a]pyrene-induced micronuclei in the embryos of the black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), *Mutation Research*, 538 (1), pp.: 31-39.
- Strunjak-Perovic, I., Lisicic, D., Coz-Rakovac, R., Topic Popovic, N., Jadan, M., Benkovic, V., y Tadic, Z. (2010) Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*, *Ecotoxicology*, 19(8), pp.: 1460-5.
- Sullivan, F. M. (2006) Reproductive Toxicity, en: Duffus, J. H. y H. G. J. Worth (eds.) *Fundamental Toxicology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge CB4 0WF, UK, pp.: 142-153.
- Sultana Shaik, A., Shaik, A. P., Jamil, K., y Alsaeed, A. H. (2016) Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of pesticide mixtures on lymphocytes, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 6516 (September), pp.: 1-7.
- Summaira Sharaf, A. K., Muhammad Zargham Khan, F. A., y Muhammad Kashif Saleemi, F. M. (2010) Clinico-hematological and micronuclear changes induced by cypermethrin in broiler chicks: Their attenuation with vitamin E and selenium, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62 (4), pp.: 333-341.
- Surai, P. F. (2002) Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham: Nottingham University Press, pp.: 5-9. Disponible en: http://www.feedfood.co.uk/download/Imm_my_2002a.pdf
- Svartz, G. V., Aronzon, C. M., y Pérez Coll, C. S. (2016a) Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo-larval development of *Rhinella arenarum*, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79 (5), pp.: 197-209.
- Svartz, G. V., Aronzon, C. M., y Pérez Coll, C. S. (2016b) Comparative sensitivity among early life stages of the South American toad to cypermethrin-based pesticide, *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), pp.: 2906-2913.
- Svartz, G. V., Meijide, F., y Pérez Coll, C. S. (2016) Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development, metamorphosis, and gonadogenesis of the South American toad *Rhinella arenarum*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, pp.: 1-7.
- Sykes, J. M. y Klaphake, E. (2008) Reptile Hematology, *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 11 (1), pp.: 481-500.
- Sykes, J. M. y Klaphake, E. (2015) Reptile Hematology, *Clinics in Laboratory Medicine*, 35 (3), pp.: 661-680.
- Szeto, Y. T., Benzie, I. F. F., Collins, A. R., Choi, S. W., Cheng, C. Y., Yow, C. M. N., y Tse, M. M. Y. (2005) A

- buccal cell model comet assay: Development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies, *Mutation Research*, 578 (1-2), pp.: 371-381.
- Talent, L. G., Dumont, J. N., Bantle, J. A., Janz, D. M., y Talent, S. G. (2002) Evaluation of western fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) and eastern fence lizards (*Sceloporus undulatus*) as laboratory reptile models for toxicological investigations, *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 21 (5), pp.: 899-905.
- Terradas, M., Martín, M., y Genescà, A. (2016) Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis, *Archives of Toxicology*, 90 (11), pp.: 2657-2667.
- Terradas, M., Martín, M., y Genescà, A. (2018) Detection of Impaired DNA Replication and Repair in Micronuclei as Indicators of Genomic Instability and Chromothripsis, en: Franck Pellestor (ed.), *Chromothripsis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1769. Humana Press, New York, NY, pp.: 197-208.
- Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T., y Fenech, M. (2008) The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls, *Mutation Research*, 638 (1-2), pp.: 37-47.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., y Fenech, M. (2009) Buccal micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 4 (6), pp.: 825-837.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., y Sasaki, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (3), pp.: 206-221.
- Timbrell, J. A. (2009) Fundamentals of Toxicology and Dose-Response Relationships, en: Timbrell, J. A. (ed.) *Principles of biochemical toxicology*. 4ta ed. Informa Healthcare USA, Inc. New York, pp.: 453.
- Tippe, A. (1987) Evidence for different mechanisms of action of the three pyrethroids, deltamethrin, cypermethrin, and fenvalerate, on the excitation threshold of myelinated nerve, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28 (1), pp.: 67-74.
- Toledo, L. F., Prado, C. P. A., y Andrade, D. V. (2004) *Tupinambis merianae* (Tegu Lizard). Fungivory., *Herpetological Review*, 35, pp.: 173-174.
- Toni, M., Dalla Valle, L., y Alibardi, L. (2007) Hard (Beta-)Keratins in the Epidermis of Reptiles: Composition, Sequence, and Molecular Organization, *Journal of Proteome Research*, 6 (9), pp.: 3377-3392.
- Tsatsakis, A. M., Nawaz, M. A., Kouretas, D., Balias, G., Savolainen, K., Tutelyan, V. A., Golokhvast, K. S., Lee, J. D., Yang, S. H., y Chung, G. (2017) Environmental impacts of genetically modified plants: A review, *Environmental Research*, 156, pp.: 818-833.
- Tsatsakis, A. M., Nawaz, M. A., Tutelyan, V. A., Golokhvast, K. S., Kalantzi, O. I., Chung, D. H., Kang, S. J., Coleman, M. D., Tyshko, N., Yang, S. H., y Chung, G. (2017) Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food, *Food and Chemical Toxicology*, 107, pp.: 108-121.
- Turcotte, D. y Talbot, A. J. (2013) Evolutionary Toxicology, en: Férard, J. F. y C. Blaise (eds.) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Dordrecht: Springer, pp.: 511-520.
- Turton, J. A., Ladds, P. W., Manolis, S. C., y Webb, G. J. (1997) Relationship of blood corticosterone, immunoglobulin and haematological values in young crocodiles (*Crocodylus porosus*) to water temperature, clutch of origin and body weight, *Australian veterinary journal*, 75 (2), pp.: 114-119.

- Udroiu, I. (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes, *Aquatic toxicology*, 79 (2), pp.: 201-4.
- UE (Unión Europea, centro de la ciencia), 2019. Toxicidad acuática. Disponible en: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/aquatic-toxicity>
- Uetz, P., Freed, P., y Hošek, J. (2016) *The reptile database. Species Numbers by higher Taxa*. Disponible en: <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html> (Accedido: 23 de marzo de 2017).
- Ugarte, R. (2014) Interaction between glyphosate and mitochondrial succinate dehydrogenase, *Computational and Theoretical Chemistry*, 1043, pp.: 54-63.
- Uggini, G. K., Patel, P. V, y Balakrishnan, S. (2012) Embryotoxic and Teratogenic Effects of Pesticides in Chick Embryos : A Comparative Study Using Two Commercial Formulations, *Environmental Toxicology*, 27 (3), pp.: 166-174.
- Uggini, G. K. y Suresh, B. (2013) Genotoxic effects of two different classes of insecticide in developing chick embryos, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 95 (6), pp.: 992-1005.
- Ujházy, E., Mach, M., Navarová, J., Brucknerová, I., y Dubovický, M. (2012) Teratology - Past, present and future, *Interdisciplinary Toxicology*, pp.: 163-168.
- Unnisa, S. A. (2019) Assessment of Pesticide Residues in Vegetables of Telangana State, en: Ozturk, M. y K. Hakeem (eds) *Plant and Human Health, Volume 2*. Springer International Publishing, Cam, pp.: 417-423.
- USEPA (2016) *Glyphosate - Regulatory Actions | Chemical Search | Pesticides | US EPA*. Disponible en: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>.
- USEPA (2018) *Basic Information about Pesticide Ingredients., US EPA website*. Disponible en: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients> (Accedido: 20 de junio de 2019).
- Vagi, M. C. y Petsas, A. S. (2019) Recent advances on the removal of priority organochlorine and organophosphorus biorecalcitrant pesticides defied by Directive 2013/39/EU from environmental matrices by using advanced oxidation processes: An overview (2007-2018), *Journal of Environmental Chemical Engineering*, pp.: 102940.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., y Scoullou, M. (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64 (2), pp.: 178-189.
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., y Morris, J. G. (2018) Environmental and health effects of the herbicide glyphosate, *Science of the Total Environment*.
- Van den Brink, P. J., Tarazona, J. V., Solomon, K. R., Knacker, T., Van den Brink, N. W., Brock, T. C. M., y Hoogland, J. P. (Hans) (2005) The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (4), p.: 820.
- Van der Oost, R., Beyer, J., y Vermeulen, N. P. E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review, *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), pp.: 57-149.
- Vazquez, P. y Zulaica, M. (2013) Intensificación agrícola y pérdida de servicios ambientales en el partido de Azul (provincia de Buenos Aires, Argentina) entre 2002-2011. *Sociedade & Natureza*, 25 (3), pp.: 543-556.

- Ventura, L., Giovannini, A., Savio, M., Donà, M., Macovei, A., Buttafava, A., Carbonera, D., y Balestrazzi, A. (2013) Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing, *Chemosphere*, 92 (1), pp.: 1-9.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., y Larramendy, M. L. (2015) Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae), *Toxicology and Industrial Health*, 31 (11), pp.: 1051-1060.
- Vera, B., Santa Cruz, S., y Magnarelli, G. (2012) Plasma cholinesterase and carboxylesterase activities and nuclear and mitochondrial lipid composition of human placenta associated with maternal exposure to pesticides, *Reproductive Toxicology*, 34 (3), pp.: 402-407.
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H., y Pizarro, H. (2010) New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems, *Ecotoxicology*, 19 (4), pp.: 710-21.
- Vera, M. S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Escaray, R., Iummato, M. M., Juárez, A., Ríos de Molina, M. D. C., Tell, G., y Pizarro, H. (2012) Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities, *Ecotoxicology*, 21 (7), pp.: 1805-1816.
- Verdade, L. M. (1997) Morphometric analysis of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*): An assessment of individuals' clutch, body size, sex, age, and area of origin., en: *Ph.D. Dissertation*. University of Florida, Gainesville, Florida, USA, pp.: 174.
- Verderame, M. y Scudiero, R. (2019) How Glyphosate Impairs Liver Condition in the Field Lizard *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810): Histological and Molecular Evidence, *BioMed Research International*, 2019, Article ID 4746283, pp.: 13.
- Verro, R., Finizio, A., Otto, S., y Vighi, M. (2009) Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. II: Screening level risk assessment of complex mixtures in surface waters, *Environmental Science and Technology*, 43 (2), pp.: 530-537.
- Vieira, C. E. D., Almeida, M. da S., Galindo, B. A., Pereira, L., y Martinez, C. B. dos R. (2014) Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas, *Neotropical Ichthyology*, 12 (1), pp.: 153-164.
- Vieira, R. C. (2016) *História natural, ecologia populacional e genética de Salvator merianae (Duméril & Bibron, 1839) (Squamata, Teiidae) no sul do Brasil*. Tesis Doctoral, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Viglizzo, E. F. y Frank, F. C. (2006) Ecological interactions, feedbacks, thresholds and collapses in the Argentine Pampas in response to climate and farming during the last century, *Quaternary International*, 158 (1), pp.: 122-126.
- Viglizzo, E. F., Frank, F. C., Carreño, L. V., Jobbágy, E. G., Pereyra, H., Clatt, J., Pincén, D., y Ricard, M. F. (2011) Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina, *Global Change Biology*, 17 (2), pp.: 959-973.
- Villaamil Lepori, E., Bovi Mitre, G., y Nassetta, M. (2013) Situación Actual de la Contaminación por Plaguicidas en Argentina, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, pp.: 25-43.
- Villarreal, R. (2018) *Variación temporal de las propiedades físicas del suelo y su impacto en la dinámica del glifosato en suelos bajo siembra directa y labranza convencional*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Vitale, I. y Kroemer, G. (2017) Spontaneous DNA damage propels tumorigenicity, *Cell Research*, 27

- (6), pp.: 720-721.
- Vitt, L. J. (1983) Tail loss in lizards: The significance of foraging and predator escape modes, *Herpetológica*, 39 (2), pp.: 151-162.
- Von Ledebur, M. y Schmid, W. (1973) The micronucleus test methodological aspects, *Mutation Research*, 19 (1), pp.: 109-117.
- Wagner, N., Mingo, V., Schulte, U., y Lötters, S. (2015) Risk evaluation of pesticide use to protected European reptile species, *Biological Conservation*, 191, pp.: 667-673.
- Wang, M., Zhou, X., Zang, X., Pang, Y., Chang, Q., Wang, C., y Wang, Z. (2018) Determination of pesticides residues in vegetable and fruit samples by solid-phase microextraction with a covalent organic framework as the fiber coating coupled with gas chromatography and electron capture detection, *Journal of Separation Science*, 41 (21), pp.: 4038-4046.
- Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby, A. G., Augustijn-Beckers, P. W. M., y Burt, J. P. (1992) The SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision-Making, en: Ware, G. W. (ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 123. Springer New York, NY, pp.: 1-155.
- Weber, J., Halsall, C. J., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K., Hermanson, M., Hung, H., y Bidleman, T. (2010) Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic, *Science of the Total Environment*, 408 (15), pp.: 2966-2984.
- Weir, S. M., Dobrovolny, M., Torres, C., Torres, C., Goode, M., Rainwater, T. R., Salice, C. J., y Anderson, T. A. (2013) Organochlorine pesticides in Squamate reptiles from southern Arizona, USA, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90 (6), pp.: 654-659.
- Weir, S. M., Yu, S., Talent, L. G., Maul, J. D., Anderson, T. A., y Salice, C. J. (2015) Improving reptile ecological risk assessment: oral and dermal toxicity of pesticides to a common lizard species (*Sceloporus occidentalis*), *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 34 (8), pp.: 1778-1786.
- Weir, S. M., Suski, J. G., y Salice, C. J. (2010) Ecological risk of anthropogenic pollutants to reptiles: Evaluating assumptions of sensitivity and exposure, *Environmental Pollution*, 158 (12), pp.: 3596-606.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., y Akcha, F. (2007) Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos, *Aquatic Toxicology*, 85 (2), pp.: 133-142.
- Wilde, S., Queisser, N., Holz, C., Raschke, M., y Sutter, A. (2018) Differentiation of Aneugens and Clastogens in the *In Vitro* Micronucleus Test by Kinetochore Scoring Using Automated Image Analysis, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60 (3), pp.: 227-242.
- Williams, G. M., Kroes, R., y Munro, I. C. (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31 (2), pp.: 117-165.
- Winck, G. R. (2007) *História Natural de Tupinambis merianae (Squamata, Teiidae) na Estação Ecológica do Taim, extremo sul do Brasil*. Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.
- Winck, G. R., Blanco, C. C., y Cechin, S. Z. (2011) Population ecology of *Tupinambis merianae* (Squamata, Teiidae): home-range, activity and space use, *Animal Biology*, 61 (4), pp.: 493-510.
- Winck, G. R. y Cechin, S. Z. (2008) Hibernation and emergence pattern of *Tupinambis merianae* (Squamata: Teiidae) in the Taim Ecological Station, southern Brazil, *Journal of Natural History*, 42 (3-4), pp.: 239-247.

- Wirth, E. F., Lund, S. A., Fulton, M. H., y Scott, G. I. (2001) Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure, *Aquatic Toxicology*, 53 (1), pp.: 9-18.
- Wise, L. D. (2013) The ICH S5 (R2) Guideline for the Testing of Medicinal Agents, en: Barrow, P. C. (ed.) *Teratogenicity Testing*. Humana Press, Totowa, NJ, pp.: 1-11.
- Wojda, A., Zietkiewicz, E., y Witt, M. (2007) Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects., *Mutagenesis*, 22 (3), pp.: 195-200.
- Wolansky, M. J. y Tornero-Velez, R. (2013) Critical consideration of the multiplicity of experimental and organismic determinants of pyrethroid neurotoxicity: A proof of concept, *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 16 (8), pp.: 453-490.
- Wolf, T., Niehaus-Rolf, C., Banduhn, N., Eschrich, D., Scheel, J., y Luepke, N. P. (2008) The hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN): Novel analyses with a series of well-characterized substances support the further evaluation of the test system, *Mutation Research*, 650 (2), pp.: 150-164.
- Wu, B., Liang, L., Ma, L., y Du, W. (2016) Effects of pesticide exposure on embryonic development and hatchling traits of turtles, *Asian Herpetological Research*, 7 (1), pp.: 28-33.
- Wu, H., Durante, M., y Lucas, J. N. (2001) Relationship between radiation-induced aberrations in individual chromosomes and their DNA content: Effects of interaction distance, *International Journal of Radiation Biology*, 77 (7), pp.: 781-786.
- Wu, T. H., Cañas, J. E., Rainwater, T. R., Platt, S. G., McMurry, S. T., y Anderson, T. A. (2006) Organochlorine contaminants in complete clutches of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) eggs from Belize, *Environmental Pollution*, 144 (1), pp.: 151-157.
- Yadav, S. S., Giri, S., Singha, U., Boro, F., y Giri, A. (2013) Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflyctis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress., *Aquatic Toxicology*, 132-133, pp.: 1-8.
- Yanosky, A. A. y Mercolli, C. (1991) Preliminary Observations on the reproductive cycle of female tegu lizards (*Tupinambis teguixin*), *Cuaderno de Herpetología*, 6 (5), pp.: 27-30.
- Yanosky, A. A. y Mercolli, C. (1992) Tegú lizard (*Tupinambis teguixin*) management in captivity at El Bagual Ecological Reserve, Argentina, *Archivos de Zootecnia*, 41, pp.: 41-51.
- Yanosky, A. A. y Mercolli, C. (1995a) A growth curve-model for the black tegu lizard *Tupinambis teguixin* (Sauria: Teiidae), *Archivos de Zootecnia*, 44, pp.: 15-21.
- Yanosky, A. A. y Mercolli, C. (1995b) Incubación artificial de huevos de iguana overa (*Tupinambis teguixin*) (Sauria: Teiidae), *Archivos de Zootecnia*, 44, pp.: 379-389.
- Yıldız, M., Cigerci Hakkı, I., Konuk, M., Fidan, A. F., y Terzi, H. (2009) Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays, *Chemosphere*, 75 (7), pp.: 934-938.
- Zaffar, H., Ahmad, R., Pervez, A., y Naqvi, T. A. (2018) A newly isolated *Pseudomonas sp.* can degrade endosulfan via hydrolytic pathway, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 152, pp.: 69-75.
- Zak, M. R., Cabido, M., Cáceres, D., y Díaz, S. (2008) What drives accelerated land cover change in central Argentina? Synergistic consequences of climatic, socioeconomic, and technological factors, *Environmental Management*, 42 (2), pp.: 181-189.
- Zapata, L. M., Bock, B. C., Orozco, L. Y., y Palacio, J. A. (2016) Application of the micronucleus test and

comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for *in situ* genotoxic monitoring, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, pp.: 108-116.

Zeliger, H. I. (2011) Pesticides, *Human Toxicology of Chemical Mixtures*, pp.: 173-185.

Zhang, C. Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J. M., Jackson, E. K., Liu, S., Meyerson, M., Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei, *Nature*, 522 (7555), pp.: 179-184.

Zúñiga-González, G. M., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B. C., Ventura-Aguilar, A. J., Ramos-Ibarra, M. L., Ramos-Mora, A., Ortíz, G. G., y Gallegos-Arreola, M. P. (2000) Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two, *Mutation Research*, 467 (1), pp.: 99-103.

Zúñiga-González, G. M., Torres-Bugarín, O., Ramos-Ibarra, M. L., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B. C., Ventura-Aguilar, A. J., Ramos-Mora, A., Ortíz, G. G., Álvarez-Moya, C., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., y Gallegos-Arreola, M. P. (2001) Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: An increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37 (2), pp.: 173-177.

Zúñiga González, G. O., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B. C., M.R. Ibarra, S. M.-G., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D., y Gallegos-Arreola, M. P. (2001) Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species, *Mutation Research*, 494 (1), pp.: 161-167.

ANEXO 2.1

SUPLEMENTO VITAMÍNICO PARA LA CRIANZA DE LAS IGUANAS

- Producto: ReptoCal
- Marca: TetraFauna
- Fabricante: Industria y Comercio de Alimentos Deshidratados Alcón Ltda.
- Origen: Brasil
- Presentación: forma concentrada de calcio, fósforo y vitamina D₃.

COMPUESTOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS

a) ENSAYO DE GENERACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO *IN VITRO* CON H₂O₂ PARA ERITROCITOS ESPECIES NO-MAMÍFERAS

- Reactivo: H₂O₂ de 100 vol., 10 M.
- Preparar una Solución Madre de 1 mM de H₂O₂= 10 µl H₂O₂ de 100 vol. + 990 µl de agua destilada (1ml)
- Tomar 10 µl de esta dilución madre y volver a llevar a 1 ml con agua destilada, agregando 990 µl.

Preparación de la muestra:

- 1) Diluir **50 µl de sangre** en **950 µl de RPMI 1640** (dilución 1/20).
- 2) Luego, tomar 5 µl y llevar con RPMI 1640 a 1 ml de acuerdo con los siguientes tratamientos:

Control Negativo	Tratamiento 10 µM de H₂O₂	Tratamiento 25 µM de H₂O₂	Tratamiento 50 µM de H₂O₂
945 µl de RPMI + 5 µl de sangre + 50 µl de H ₂ O destilada	985 µl de RPMI + 5 µl de sangre + 10 µl de H ₂ O ₂ (1 mM)	970 µl de RPMI + 5 µl de sangre + 25 µl de H ₂ O ₂ (1 mM)	945 µl de RPMI + 5 µl de sangre + 50 µl de H ₂ O ₂ (1 mM)

- 3) Incubar 30 minutos como mínimo, a 25 °C. Al cumplirse el tiempo, centrifugar 5´ a 1000 rpm.
 - Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet*. Tomar 10-15 µl para hacer el ensayo de viabilidad. Al *pellet* restante, agregarle 200 µl de agarosa BPF y continuar con el protocolo para Ensayo Cometa.

b) ENSAYO DE VIABILIDAD

- 1) Solución de tinción:
 - 100 µg/ml Bromuro de etidio (Sigma)
 - 100 µg/ml Naranja de acridina (Fluka)

-Buffer fosfato salino (PBS) 1X, libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}

c) ENSAYO COMETA

1) Agarosa de punto fusión normal (Sigma A9539; CAS 9012-36-6) y de bajo punto de fusión (Sigma A9414; CAS: 39346-81-1):

-Se preparan al 1% con PBS 1X y se separan alícuotas que se mantienen a 4 °C hasta su uso.

2) Solución de lisis stock:

-2,5 M NaCl (Sigma; CAS 7647-14-5)

-100 mM Na_2EDTA (Sigma; CAS 6381-92-6)

-10 mM Tris (Sigma; CAS 77-86-1)

Se debe ajustar a pH 10 con NaOH (Sigma; CAS 1310-73-2)

3) Solución de lisis final: Se prepara inmediatamente antes de su uso

-40 ml de solución stock

-5 ml Dimetil sulfóxido (DMSO; Fluka; CAS 67-68-5)

-400 μl Tritón (Sigma; CAS 9002-93-1)

Refrigerar a 4-10 °C, 30-60 minutos antes de usar

4) Buffer de electroforesis: consta de 2 soluciones stock

A) NaOH (Sigma) 10 N

B) Na_2EDTA (Sigma) 200 mM, pH 10

- Para preparar 1 litro de buffer de electroforesis pH13, agregar a 1 lt de agua bidestilada e inmediatamente previo a su uso, 30 ml solución A (300 mM) y 5 ml solución B (1 mM).

5) Buffer de neutralización: Tris (Sigma) 0,4 M, se debe ajustar a pH 7,5 con HCl concentrado.

d) ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

1- Solución de tinción convencional:

-Giemsa (Biopur; CAS 51811-82-6)

-Agua estabilizada (1 parte de estabilizador en 49 partes de agua destilada)

Se prepara en el momento previo a su uso una solución 1:10 de Giemsa comercial en agua estabilizada, se centrifuga durante 20 min a 3000 rpm y se filtra con papel de filtro para remover los grumos y depósitos del colorante que puedan interferir en el recuento de MN.